

„ISOBARBALOIN“ AUS ALOE BARBADENSIS (PH. EUR. III) –
ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG ALS
DIASTEREOMERE 7 – HYDROXYALOINE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
REINHARD VÖTIG
aus Osnabrück

Berlin 1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546614_0008

"ISOBARBALOIN" AUS ALOE BARBADENSIS (PH. EUR. III)-
ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG ALS DIASTEREO-
MERE 7-HYDROXYALOINE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
REINHARD VÖTIG
aus Osnabrück

1. Gutachter: Prof. Dr. R. Hänsel

2. Gutachter: Prof. Dr. W. Löwe

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 1983

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Rudolf Hänsel und Herrn Dr. H.-W. Rauwald am Institut für Pharmakognosie und Phytochemie der Freien Universität durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Hänsel danke ich für die Überlassung des Themas, Diskussionsbereitschaft und Förderung meiner Arbeit. Herrn Dr. Rauwald danke ich für wertvolle Ratschläge zu Theorie und Praxis des phytochemischen Arbeitens.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit in einem sehr angenehmen Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. EINLEITUNG	
1.1. Problemstellung und Zielsetzung	1
1.2. Allgemeine Vorbemerkungen zu Aloe barbadensis	3
1.2.1. Zum Terminus Aloe; Arzneibuchdefinition	3
1.2.2. Botanik, Herkunft, Vorkommen, Gewinnung, Wirkung und Anwendung	3
1.2.3. Vergleich der Inhaltsstoffe (Anthra- und Chromonderivate) von Aloe barbadensis und Aloe capensis (Ph. Eur. III)	5
1.2.4. Pharmaziehistorischer Exkurs zu "Iso- barbaloin" und Barbaloin (Aloin) aus Aloe spec.	8
1.2.5. Bisherige Darstellungsverfahren für "Isobarbaloin" und Barbaloin	14
2. HAUPTTEIL	15
2.1. Neue dünnschichtchromatographische Ana- lyse von Aloe barbadensis (Ph. Eur. III) im Vergleich zu Aloe capensis (Ph. Eur. III)	15
2.1.1. Verfahren der Ph. Eur. III	15
2.1.2. Ein neues Fließmittel	16
2.2. Isolierung	20
2.2.1. Isolierungsschema	20
2.2.2. Anreicherung von 7-Hydroxyaloin und Aloin durch die Aceton/Isobutanol- Methode	22

2.2.3.	Einsatz der Droplet Countercurrent Chromatography (DCCC) zur Isolierung der 7-Hydroxyaloine	23
2.2.3.1.	Allgemeine Bemerkungen zur Droplet Countercurrent Chromatography (DCCC) und ihrer Anwendung in der Isolierung von Anthraderivaten	23
2.2.3.2.	Reindarstellung der 7-Hydroxyaloine	26
2.2.4.	Weitere Trennversuche	31
2.2.4.1.	Säulenchromatographische Trennversuche	31
2.2.4.2.	Herstellung und Isolierung eines 7-Hydroxyaloinacetates	33
2.3.	Identifizierung des "Isobarbaloins" als Gemisch der diastereomeren 7-Hydroxyaloine und deren Strukturauflösung	34
2.3.1.	IR- und UV-Spektren	34
2.3.2.	Oxidative Spaltung	39
2.3.3.	EI- und FAB-Massenspektren	41
2.3.4.	^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren	45
2.3.5.	Charakterisierung des Peracetylderivats, Umwandelbarkeit 7-Hydroxyaloin A $\rightleftharpoons$ 7-Hydroxyaloin B	66
2.3.6.	Optische Drehung	69
2.3.7.	CD-Spektren	70
2.3.8.	Abschließende Bemerkungen	74
2.4.	Zum Aglykon der 7-Hydroxyaloine	74

	Seite
3. EXPERIMENTELLER TEIL	76
3.1. Allgemeine Angaben	76
3.1.1. Chromatographie	76
3.1.2. Spektroskopie	78
3.1.3. Schmelzpunktbestimmung	80
3.1.4. Elementaranalysen	81
3.2. Spezielle Angaben	81
3.2.1. Herkunft der Droge	81
3.2.2. Bearbeitung der Droge	81
3.2.2.1. Anreicherung der Glukosyle mittels der Aceton/Isobutanol-Methode	81
3.2.2.2. Anreicherung der diastereomeren Anthron- C-Glukosyle durch Mehrfachkristalli- sation	82
3.2.2.3. Isolierung von 7-Hydroxyaloin A und Aloin A mittels DCCC (aufsteigender Ar- beitsmodus)	83
3.2.2.4. Isolierung von 7-Hydroxyaloin A und Aloin A mittels DCCC (absteigender Ar- beitsmodus)	84
3.2.2.5. Isolierung von 7-Hydroxyaloin B und Aloin B mittels DCCC	84
3.2.2.6. Säulenchromatographische Vorversuche zur präparativen Isolierung von 7-Hydroxyaloin A	85
3.2.2.7. Acetylierung des nach 3.2.2.2. erhal- tenen Mehrfachkristallisats	86

	Seite
3.2.2.8. Isolierung von 7-Hydroxyaloinnona- acetat aus dem nach 3.2.2.7. erhal- tenen Acetatgemisch	87
3.2.3. Chemischer Abbau und chemische Um- wandlung der 7-Hydroxyaloine	87
3.2.3.1. Oxidative Spaltung von 7-Hydroxyaloin A mittels Eisen(III)-chlorid	87
3.2.3.2. Umwandlung 7-Hydroxyaloin $A \rightleftharpoons B$ und Aloin $A \rightleftharpoons B$ in Boraxlösung	88
3.2.3.3. Umwandlung 7-Hydroxyaloin $A \rightleftharpoons B$ und Aloin $A \rightleftharpoons B$ in wäßriger Lösung	89
Zusammenfassung und Diskussion	89
Literaturverzeichnis	93
Lebenslauf	97

1. EINLEITUNG

1.1. Problemstellung und Zielsetzung

"Isobarbaloin " ist ein charakteristischer Inhaltsstoff der sogenannten westindischen Aloe-Sorten (Curacao-, Barbados- und Venezuela-Aloe), die als Droge Aloe barbadensis oder Curacao-Aloe in das Europäische Arzneibuch aufgenommen sind.

"Isobarbaloin" ist als Naturstoff seit über 80 Jahren bekannt³³⁾. Ähnlich wie das Aloin, zwischen dessen erstmaliger Beschreibung³¹⁾ und endgültiger Strukturaufklärung⁴⁰⁾ ca. 100 Jahre liegen, hat auch das "Isobarbaloin" zahlreiche Forschergruppen beschäftigt, ohne daß verlässliche Angaben zur Struktur vorliegen. Während die genaue Konstitution des Aloins aufgrund der ungewöhnlichen Verknüpfung eines Zuckers mit dem Aglykon über eine C-C-Bindung erst 1952 aufgeklärt worden ist, konnte das erheblich oxidationsempfindlichere "Isobarbaloin" bislang nicht rein dargestellt werden. Bezüglich seiner chemischen Natur wurde "Isobarbaloin" aufgrund von chemischen Experimenten sowie von UV- und IR-Daten bisher als ein Stereoisomeres des Barbaloins (= Aloin)⁴⁰⁾, insbesondere als das dem Barbaloin korrespondierende α -Glukosyl-diastereomere²⁴⁾, vermutet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das sogenannte "Isobarbaloin" aus Aloe barbadensis zu isolieren, rein darzustellen und seine Struktur aufzuklären.

Damit verbunden will diese Arbeit einen Beitrag zur Grundlagenforschung der Arzneibuchanalytik leisten. Es handelt sich dabei

um ein bisher ungeklärtes Problem, das im Zusammenhang mit der Prüfung der offizinellen Aloe-Drogen auf Identität und Reinheit steht⁵⁹⁾. Das Fehlen von "Isobarbaloin" in Aloe capensis dient in der Analytik der Ph.Eur.III als Hilfsmittel zur Identitäts- und Reinheitsprüfung der Aloe-Drogen. So werden die beiden offizinellen Kap- und Curacao-Aloe anhand der Reagenzglasreaktion des "Isobarbaloins" nach ROSENTHALER⁴⁹⁾ identifiziert. Nach Zugabe von Bromwasser zur Prüflösung zeigt eine Violettfärbung der Lösung die Anwesenheit von "Isobarbaloin" und damit das Vorliegen von Curacao-Aloe an. In der Reinheitsprüfung zur Unterscheidung von Kap- und Curacao-Aloe muß auf dem Chromatogramm der Untersuchungslösung nach entsprechender Detektion direkt unterhalb der Aloinzone (R_f 0,4 - 0,5) eine violette, dem "Isobarbaloin" entsprechende Zone (R_f 0,35 - 0,45) auftreten, die bei Kap-Aloe fehlen muß.

Die Bedeutung des "Isobarbaloins" für die Analytik der Aloe-Drogen geht darüberhinaus aus einigen bekannten Farbreaktionen zur Unterscheidung der verschiedenen Aloe-Sorten hervor, die auf dem Gehalt an "Isobarbaloin" beruhen. Dabei weisen Rot- bzw. Violettfärbung auf das Vorliegen westindischer Aloe-Sorten hin:

1. "Kluges Isobarbalointest"³²⁾: Probe + $\text{CuSO}_4/\text{NaCl}$ (ÜAB 9)
2. nach Rosenthaler (s.o.)⁴⁹⁾: Probe + Bromwasser (Ph.Eur.III, BP 80, USP 19)
3. nach Rosenthaler⁴⁸⁾: Probe + NaOH /Ammoniumsalz
4. nach Keenan und Welsh³¹⁾: Probe + AuCl_3
5. Probe + HNO_3 (USP 20)

1.2. Allgemeine Vorbemerkungen zu Aloe barbadensis

1.2.1. Zum Terminus Aloe; Arzneibuchdefinition

Der Begriff Aloe stellt sowohl einen Gattungsnamen als auch eine Arzneibuchbezeichnung dar. Die Gattung Aloe zählt zur Familie der Liliaceae (Unterfamilie: Asphodelioideae, Tribus: Aloineae, Subtribus Aloinae). Nach Definition der Ph.Eur.III ist Curacao-Aloe "der zur Trockene eingedickte Saft der Blätter von Aloe barbadensis MILLER und enthält mindestens 28% Anthracenderivate, berechnet als wasserfreies Barbaloin".

1.2.2. Botanik, Herkunft, Vorkommen, Gewinnung, Wirkung und Anwendung

Die Gattung Aloe umfaßt rund 200 Spezies ¹⁹⁾; ihre Heimat ist das südliche und östliche Afrika. Die ursprüngliche Heimat der von uns untersuchten Aloe barbadensis scheint Nordafrika zu sein ⁵⁶⁾. Von hier hat sie sich in den gesamten Mittelmeerraum, nach Ostindien (Madras) und Bengalen ausgebreitet. Nach Westindien gelangte sie im 16. Jahrhundert und wurde hier auf Barbados, Aruba, Jamaica, Bonaire und auf St. Helena kultiviert. Als Anbauggebiete haben heute nur die Antilleninseln Aruba und Bonaire sowie das Küstengebiet von Venezuela Bedeutung ⁵⁹⁾. Die Droge wird über Curacao in den Handel gebracht.

Die Pflanze selbst zeigt die typische Anpassung der Xerophy-

ten an ein trockenes Klima ⁵⁶⁾: ihre Blätter sind dick, fleischig, schleimreich und von einer dicken Epidermis überzogen. Sie hat einen kurzen, bis zu 60 cm dicken Stamm, auf dem stengelumfassend in der Jugend aufrechte, später seitlich neigende, blaßgrüne oder meist gefleckte Blätter mit weißen, an der Spitze bräunlichen Zähnen ragen. Der bis zu 1 m hohe, fast nackte Blütenschaft trägt eine zylindrische Blütentraube mit zahlreichen hängenden, gelben Blüten ⁵⁶⁾.

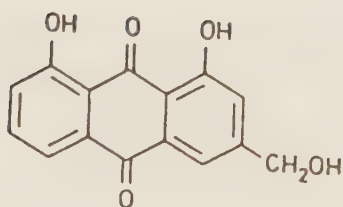
Die westindische Aloe-Droge wird im Frühjahr gewonnen. Nach der Blütezeit werden die Blätter abgeschnitten und mit der Schnittfläche nach unten in V-förmige Rinnen gestellt. Mehrere solcher Rinnen münden in ein Faß, in dem der Saft gesammelt wird. Die Temperatur beim Eindampfen des Saftes wird meist niedrig gehalten, so daß Curacao-Aloe meist in Form der Hepatica-Ware in den Handel gelangt. Neuerdings werden auch schonende Trocknungsmethoden angewandt, in erster Linie die Vakuumsprühtrocknung ¹⁹⁾. Die so gewonnene Droge ist allerdings in der Ph.Eur. nicht zugelassen, während sie in der Ph.Helv.VI offizinell ist.

Die äußerliche und innerliche Anwendung von Aloe-Präparationen hat eine jahrtausendalte Tradition ⁵⁶⁾. Man kann wohl davon ausgehen, daß "Cleopatra nicht die in den heutigen Arzneibüchern erwähnte Aloe, sondern den in der Pflanze enthaltenen Schleim auf die Haut auftrug" ³⁰⁾, der aus Aloe barbadensis gewonnen, auch heute vielfach in kosmetischen Cremes angewandt wird ³⁰⁾. Die innerliche Anwendung als Laxans findet

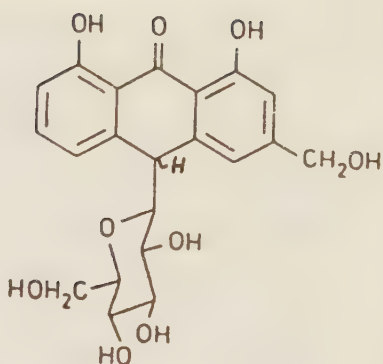
man bereits bei DIOSCURIDES (1. Jahrh.n.Chr.) beschrieben^{zit.n. 56)}
Er unterschied zwei Sorten von ἁλόη (= Aloe), die ψαμμῶδες
(= sandige) und die ἥπατις (hepatica). SCRIBONIUS LARGUS
erwähnt Aloe-Pillen und zusammengesetzte Augensalben, die
Aloe enthielten. Bezüglich der Verwendung von Aloe als Tonicum
ist ein arabisches Sprichwort überliefert^{zit.n. 56)}, wonach
eine unangenehme Sache oder etwas extrem bitteres als
"ammarru min es-sabir" (= bitterer als Aloe) bezeichnet wird.
In den Kräuterbüchern des Mittelalters, so im Nördlinger Register
oder bei Albertus Magnus, ist die Verwendung von Aloe als
Laxans beschrieben. Die offizinellen Aloe barbadensis und
Aloecapensis (P.Eur.III) und Aloes Extractum (DAB 8) gehören
zu den stark dickdarmwirksamen Abführdrogen heutiger Arzneibücher.
Nach HÄNSEL²⁰⁾ sind die pharmakokinetischen Daten nicht bekannt;
insbesondere ist unklar, ob die Dickdarmflora den Zucker aus dem Aloin
abzuspalten vermag, da dieser nicht in üblicher glykosidischer Bindung
vorliegt, sondern in fester Kohlenstoff-Kohlenstoffbindung mit dem
Aglykon verknüpft ist. Sicherlich bildet sich die eigentliche Wirkform
auch im Falle des Aloins erst im Dickdarm.

1.2.3. Vergleich der Inhaltsstoffe (Anthra- und Chromonderivate) von Aloe barbadensis und Aloe capensis (Ph.Eur.III)

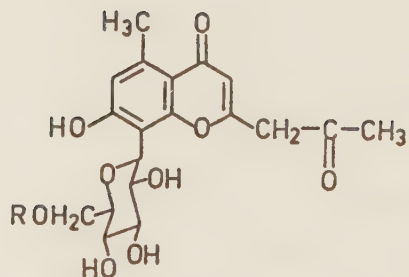
Hauptinhaltsstoff der beiden offizinellen Drogen ist das Aloin⁴⁰⁾, das in Curacao-Aloe in Mengen bis zu 40%, in Kap-Aloe bis zu 27% enthalten sein kann⁵⁹⁾. Daneben finden sich



Aloeemodin

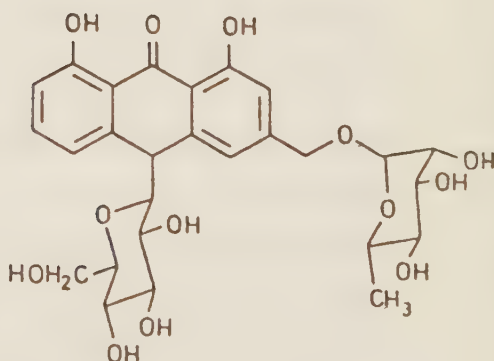


Aloine A und B



R= H: Aloesin (= Aloeresin B)

R= p-Cumaryl: Aloeresin A



Aloinoside A und B

Abb. 1: Formelübersicht über die bekannten Anthrachinon-, Anthron- und Chromonderivate aus Aloe barbadensis und Aloe capensis Ph. Eur. III

Aloe barbadensis Ph. Eur. III		Aloe capensis Ph. Eur. III		Literatur	
=====					
Aloeemodin		Aloeemodin		AWE, W. und H. J. KÜMMEL	
				Arch. Pharm. 295	819 (1963)
Alain		Alain		MOHLEMANN, H.	
				Pharm. Acta Helv. 27	17 (1952)
		Alainosid A (Struktur ?)		HÖRHAMMER, L.; H. WAGNER und	
		Alainosid B		G. BITTNER; 1.) Arzneim.-	
				Forsch. 13	537 (1963); 2.) Z.
				Naturforsch. 193	222 (1964)
				LEGER, E.; Bull. Soc. chim.	
				21	668 (1899)
				HOLDSWORTH, D.K.; Planta	
				Med. 22	54 (1972)
				HAYNES, L.J. und D.K. HOLDS-	
				WORTH; J. Chem. Soc.	
				2581	(1970)
				RATTENBERG, M.: Dissertation	
				München	(1969)

Tabelle 1 : Bisher beschriebene Anthron-, Anthrachinon- und Chromonderivate aus
Aloe barbadensis und Aloe capensis (Ph. Eur. III).

die Chromone Aloeson und dessen 8-C-Glukosyl Aloesin (= Aloeresin B) ³¹⁾. In geringen Mengen wird Aloeemodin gefunden, das vermutlich bei der Aufarbeitung des Blattsafte entsteht ²⁾.

Aloe barbadensis ist durch das vikariierende Auftreten des "Isobarbaloins", Aloe capensis durch das der Aloinoside A und B gekennzeichnet. Bei den Aloinosiden handelt es sich um vermutlich stereoisomere Glykoside (Rhamnoside) des Aloins ^{27, 29)}. Bisher gilt nur die Struktur des Aloinosids B als gesichert ⁵⁹⁾. Bei Aloinosid A dürfte es sich um ein Isomer handeln. Von den Chromonderivaten wurde in der Kap-Aloe zudem das 6'-p-Cumaryl-Aloesin (= Aloeresin A) gefunden ⁴¹⁾.

1.2.4. Pharmaziehistorischer Exkurs zu "Isobarbaloin" und Barbaloin (Aloin) aus Aloe spec.

Eine Substanz der Benennung Aloin wurde erstmals 1852 von den Edinburgher Apothekern T. und H. SMITH ⁵¹⁾ aus Barbados-Aloe isoliert. Als GROVES ¹⁴⁾ (1856) aus Socotra-Aloe "Socaloin" isoliert hatte, taufte er das aus Barbados-Aloe erhaltene Produkt in Unkenntnis der chemischen Identität in "Barbaloin" um. In der Folge wurden aus Curacao-Aloe "Curaloin", aus Zanzibar-Aloe "Zanaloin", aus Natal-Aloe "Nataloin" isoliert, zuletzt aus Kap-Aloe das "Capaloin" ⁵⁵⁾. Insbesondere den Arbeiten LEGERS ³⁷⁾ war es zu verdanken, daß diese Aloine als weitgehend identisch erkannt wurden, allein dem Nataloin sollte eine andere Konstitution zukom-

men. ROCHLEDER und CZUMPELIK ⁴⁷⁾ und TSCHIRCH und PETERSEN ⁵⁸⁾ schrieben dem Aloin Glykosidnatur zu, wobei Aloeemodin der aglykonische Bestandteil sein sollte. LEGER ³⁶⁾ formulierte das Aloin als Arabinosid des Aloeemodins, wobei die Zuckerkomponente nach "hydrolytischer bzw. säurehydrolytischer Spaltung über mehrere Monate (!) identifiziert wurde. Anzu merken ist, daß es sich in Wirklichkeit um ein Oxidationsprozeß gehandelt haben muß, da keine die Oxidation hemmende Schutzmaßnahmen angegeben sind ²⁴⁾.

Im Zuge dieser Untersuchungen wurde erstmals von LEGER ³³⁾ (1898) das "Isobarbaloin" als Inhaltsstoff von Curacao-, Cuba- und Barbados-Aloe erwähnt und als Isomeres des Barbaloins charakterisiert. Bei seinen Versuchen, "Isobarbaloin" zu isolieren, beobachtete LEGER ³⁵⁾, daß sich Aloin und "Isobarbaloin" durch Mehrfachkristallisation aus Methanol zwar anreichern, jedoch nicht voneinander trennenließen. Weitgehend reines "Isobarbaloin" glaubte er aus den stark eingeeengten Mutterlaugen der Aloindarstellung erhalten zu haben. Spätere chromatographische Untersuchungen von DURAND und PARIS ⁸⁾ sowie AWE und KÜMMEL ²⁾ haben gezeigt, daß das von LEGER dargestellte "Isobarbaloin" tatsächlich nicht einheitlich war; die Substanz enthielt danach überwiegend Aloin und nur geringe Mengen "Isobarbaloin". LEGER charakterisierte das "Isobarbaloin" als wesentlich empfindlicher gegenüber Oxidationsmitteln als das Aloin ³⁵⁾. Nach seiner Auffassung sollte auf diesem Inhaltsstoff die Reaktion nach KLUNGE (vgl. 1.1.) beruhen ³⁵⁾, die bis dahin als Nachweis auf "Barbaloin" galt. Hinsichtlich

seiner chemischen Natur nahm LEGER ³⁴⁾ an, daß sich Aloin und "Isobarbaloin" lediglich durch die Verknüpfung des Zuckers mit dem Aglykon am C-1- bzw. C-8-Hydroxyl unterschieden, also Stellungsisomere darstellten. Diese Formulierung konnte jedoch nicht das von normalen Glykosiden abweichende Verhalten bei der sauren Hydrolyse erklären. Daher korrigierte LEGER später seine Formel dahin, daß er eine "ätherartige" Verknüpfung des Zuckers mit dem jeweiligen Hydroxyl annahm ^{36, 38)}.

Aufgrund der Fluoreszenz des Aloins nach Boraxzugabe griff HAUSER ²²⁾ (1931) die schon von TSCHIRCH ⁵⁷⁾ vermutete Verknüpfung eines Zuckers mit einem reduzierten Anthrachinonkern wieder auf (vgl. Tab. 2). Aloin sollte demnach das Arabinosid des Aloeemodin-9-anthranols, "Isobarbaloin" das des Aloeemodin-10-anthranols sein, wobei auch er eine "ätherartige" Verknüpfung annahm. Diese Aussage stand jedoch im Widerspruch zu dem Untersuchungsergebnis von GARDNER und JOSEPH ¹²⁾, die nach Boraxspaltung von Aloin und "Isobarbaloin" nur Aloeemodin-9-anthranol erhalten hatten.

EDER und ZINN ⁹⁾ kamen nach ihren Untersuchungen zu dem Schluß, Aloin sei ein Hexosederivat des Aloeemodin-9-anthrone. Der Zucker könnte über zwei Bindungsstellen, über das C-1-Hydroxyl und über das Hydroxyl der Hydroxymethylseitengruppe verbunden sein. Als erste Autoren ermittelten sie die korrekte Bruttoformel des Aloins mit $C_{21}H_{22}O_9$.

Die endgültige Strukturaufklärung des Aloins durch MÖHLEMANN⁴⁰⁾, die Formulierung des Aloins als 10-C-Glukosyl des Aloeemodin-Anthrone, ließ neue Schlüsse bezüglich der Isomerie der Aloine zu. MÖHLEMANN vermutete, daß "natürliches" Aloin hinsichtlich der Asymmetrie am Mesokohlenstoff ein Racemat darstellte, während "Isobarbaloin", das bei Laugenspaltung wie das Aloin Aloeemodin-9-anthron lieferte, höchstwahrscheinlich der eine oder andere optische Antipode der möglichen Aloine wäre. Zwischen Aloin und "Isobarbaloin" bestünde ein ähnlicher Zusammenhang, wie er von STOLL und BECKER⁵³⁾ zwischen den Sennosiden A und B aufgezeigt wäre. Ebenfalls hielten HAYNES und Mitarb.²⁴⁾ Aloin und "Isobarbaloin" für optische Antipoden: während Aloin eine rechts drehende Verbindung darstellte, drehte das Isomere "Isobarbaloin" die Ebene des polarisierten Lichtes nach links. Demgemäß vermuteten sie, "Isobarbaloin" als das dem Aloin korrespondierende α -Glukosyl-diastereomere²⁴⁾. Diese Ansicht fand Bestätigung von BARNES und HOLFELD³⁾ aufgrund von UV- und IR-spektroskopischen Befunden für beide Isomeren. Der Vergleich der UV-Spektren von 10(1,5 Anhydroglykosyl)-chrysazin-9-anthron mit denen von Aloin und "Isobarbaloin" sowie deren identischer Verbrauch von 1 mol Perjodat bei der oxidativen Spaltung machte es wahrscheinlich, daß der Unterschied zwischen beiden nur ein stereochemischer sei.

Die chemische Instabilität, die Empfindlichkeit gegenüber Oxidationsmitteln und das mit dem Homonataloin vergleich-

bare Fluoreszenzverhalten des "Isobarbaloins" ließen einige wenige Autoren an der Isomerentheorie zweifeln ^{8, 28)}. Bezüglich der chemischen Natur des "Isobarbaloins" finden sich jedoch bis heute in der einschlägigen Literatur die von MÜHLEMANN und HAYNES vermutete Ansicht (vgl. Komm. Ph.Eur.III ⁵⁹⁾ und Übersicht bei THOMSON ⁵⁴⁾). Die Existenz zweier isomerer Aloine an sich war durch die Spaltung der Aloinglukoside Cascarosid A und B bewiesen ¹⁰⁾. Der Nachweis zweier diastereomerer Aloine in chromatographisch einheitlichem Handelsaloin sowie in Pflanzenmaterial (Frischpflanze und Droge) gelang jedoch erst 1980 AUTERHOFF, GRAF und Mitarb. ¹⁾ bzw. GRÜN und FRANZ ¹⁶⁾ mittels der HPLC-Methode. Ebenso fiel Aloin bei der chemischen Synthese in zwei diastereomeren Formen A und B an, wonach die Glukosylreste in β -Bindung mit dem Anthronsystem verknüpft sein mußten ¹⁾. Die gegenseitige Umwandelbarkeit über die Anthranolform deutete darauf hin, daß die beiden Aloine sich nur in der räumlichen Anordnung der Glukosylreste am C-10 des Aglykons unterschieden ¹⁶⁾. Die bei AUTERHOFF, GRAF und Mitarb. beschriebene Konfigurationsbestimmung des C-10 des Anthronrestes in beiden Aloinen aufgrund der Auswertung der ¹H-NMR-Spektren ließ sich nach einer neuen ¹H-NMR-Analyse von RAUWALD und ROTH ⁴⁶⁾ nicht aufrecht erhalten, die erstmals spektroskopisch die β -Konfiguration des Glukosylrestes in beiden Aloinen nachwies. Die Konfiguration an C-10 des Anthronrestes ließ sich NMR-spektroskopisch nicht ermitteln.

Tabelle 2: Zur chemischen Natur des "Isobarbaloins" aus Aloe barbadensis

Isobarbaloin = 8-O-Arabinosid des Aloeemodins (Barbaloin = 1-O- " ")	LEGER, 1902
Isobarbaloin = 10-O-Arabinosid des Aloeemodin-10-anthranols (Barbaloin = 9-O- " - 9 - ")	HAUSER, 1931
Isobarbaloin = Stereoisomere 9-O-Arabinoside des Aloeemodin-9-anthranols (Barbaloin =	GARDNER, 1937
Isobarbaloin = "der eine oder andere optische Antipode der möglichen Aloine"	MÜHLEMANN, 1952
Isobarbaloin = "das dem Barbaloin korrespondierende α -Glukosyldiastereomere"	HAYNES, 1963

Chemical Abstracts ⁷⁾ führt jetzt unter dem Namen "Isobarbaloin" konsequenterweise das Aloindiastereomere B (n. AUTERHOFF), das aufgrund der beschriebenen Eigenschaften nicht mit dem "Isobarbaloin" LEGERS identisch sein kann.

1.2.5. Bisherige Darstellungsverfahren für "Isobarbaloin" und Barbaloin (Aloin)

Da die Isolierungsverfahren für Aloin und "Isobarbaloin" in direktem Zusammenhang stehen, sind nachstehend die bekanntesten Methoden aufgeführt. Zur Isolierung von Aloin aus Aloe-Drogen sind verschiedene Wege beschritten worden. Fällungen mit basischem Bleiacetat ¹⁸⁾ und Erdalkalisalzen ⁵⁰⁾ hatten zu unbefriedigenden Ausbeuten geführt. Aus dem gleichen Grund und wegen mangelnden Trennvermögens haben klassische säulenchromatische Verfahren keine Bedeutung erlangt ^{6, 15, 60)}. Übliche Verfahren zur Darstellung von Aloin aus Drogenmaterial bedienten sich verschiedener Kristallisationsmethoden, die teilweise heute noch bedeutsam sind. In den ältesten Verfahren wurde entweder aus angesäuertem Wasser oder aus verschiedenen organischen Lösungsmitteln kristallisiert. Von den neueren Methoden ist die sogenannte Aceton/Isobutanol-Methode nach EDER und ZINN ⁹⁾ bekannt, die Aloin in optimalen Ausbeuten liefert ⁶⁰⁾. Bei der Darstellung des "Isobarbaloins" machte LEGER ³⁵⁾ die Beobachtung, daß "Isobarbaloin" bei der Gewinnung aus Curacao-Aloe nach einem von ihm entwickelten Kristallisationsverfahren immer gemeinsam mit dem Aloin auskristallisierte. Die so erhaltenen Substanzgemische kristallisierte er noch 2 - 3 x

um und sammelte die Mutterlaugen, die weiterhin vorwiegend aus "Isobarbaloin" und Aloin bestanden. Weitgehend reines "Isobarbaloin" glaubte er dann in Händen zu haben, wenn die Kristalle sich am Glasrand absetzten und wie Krusten aussahen. Spätere Untersuchungen haben hingegen gezeigt, daß es sich um ein noch stark verunreinigtes Produkt gehandelt haben muß ²⁾. In den Jahren 1979/80 gelang den Arbeitsgruppen um AUTERHOFF ¹⁾ und FRANZ ¹⁶⁾ die Reindarstellung der diastereomeren Aloine A und B mittels präparativer Hochdruckflüssigkeitchromatographie. Eine einfache, leistungsfähige, schonende und kostengünstige Methode zur präparativen Trennung der Aloine wurde in unserem Arbeitskreis ⁴²⁾ durch die Anwendung der neuen flüssig-flüssig-Gegenstrom-Chromatographie-Technik der Droplet-Countercurrent-Chromatography (DCCC), zu deutsch Tropfen-Gegenstrom-Chromatographie, angewandt.

2 Hauptteil

2.1. Neue dünnschichtchromatographische Analyse von Aloe barbadensis Ph.Eur.III im Vergleich zu Aloe capensis Ph.Eur.III

2.1.1. Verfahren der Ph.Eur.III

Die Ph.Eur.III prüft auf Reinheit und Identität ⁵⁹⁾ der offiziellen Aloe-Drogen mittels der Dünnschichtchromatographie. Die dort angegebene Methode wird mit dem Fließmittel Ethyl-

acetat-Methanol-Wasser (100 : 17 : 13) durchgeführt. Die Detektion erfolgt mit methanolischer KOH-Lösung und Betrachtung der Fluoreszenzen unter der Analysenquarzlampe bei 365 nm. Anschließend wird die Platte bei 110° C im Trockenschrank erhitzt und am Tageslicht betrachtet.

Auf dem Chromatogramm von *A. barbadensis* müssen die gelbe Fluoreszenz des Aloins, die blaue des Aloesins und nach Erhitzen im Trockenschrank die violett gefärbte Zone des "Isobarbaloins" nachweisbar sein. Das Chromatogramm von *A. capensis* muß neben den Zonen des Aloins und Aloesins die beiden Zonen der Aloinoside A und B zeigen. Die Auftrennung der Aloinoside gelingt aber nicht in jedem Fall, sodaß sie häufig auch als eine Zone erscheinen⁵²⁾. Nach Erhitzen im Trockenschrank darf die violette Zone des "Isobarbaloin" nicht erscheinen. Im schematischen Chromatogrammbild der Abb. 2 ist der dc-Vergleich der offizinellen *A. barbadensis* und *A. capensis* entsprechend der Ph.Eur.III unter Verwendung authentischer Referenzsubstanzen wiedergegeben.

2.1.2. Ein neues Fließmittel

Die Dünnschichtchromatographie in dem neuen, von RAUWALD⁴⁴⁾ vorgeschlagenen Fließmittelsystem CHCl_3 - MeOH- H_2O - HCOOH 7 : 13 : 8 : 0,1 (mobile Phase = Unterphase) zeigt gegenüber dem 2.1.1. beschriebenen Verfahren der Ph.Eur.III folgende wesentliche Verbesserungen: Während "Isobarbaloin" nach der Arzneibuchvorschrift als einheitliche DC-Zone auftritt und demgemäß charakterisiert ist, sind in unserem quaternären

Fließmittel 2 violett gefärbte Zonen für diesen Inhaltsstoff nachweisbar. Ebenfalls sind die diastereomeren Aloine A und B als zwei getrennte Zonen zu beobachten⁴³⁾. Im Falle der Aloine handelt es sich bei der Zone mit dem größeren R_f -Wert um das A-Diastereomere (Al A), bei der mit kleinerem R_f -Wert um das B-Diastereomere (Al B, Zuordnung in Anlehnung an AUTERHOFF et al.¹⁾). Beim "Isobarbaloin" ist entsprechend die Zone mit höherer Wanderungsweite mit 7-Hydroxyaloin A (7-OH Al A), die mit tieferer Laufweite mit 7-Hydroxyaloin B (7-OH Al B) bezeichnet. In Abb. 2 ist das UV-Bild eines mit KOH besprühten Chromatogramms mit beiden Aloe-Extrakten als Schema dargestellt. Bemerkenswert ist die deutliche Trennung der Aloino-side A und B auf dem Chromatogrammbild von Aloe capensis, die bei der Verwendung der Arzneibuchvorschrift nicht immer gewährleistet ist⁵²⁾. Die Trennung der drei Diastereomerenpaare der Anthronglukosyle zeichnet sich durch eine gute Reproduzierbarkeit aus, die aufgrund vieler Laboreinsätze festgestellt wurde. Nach den Angaben von GRÜN und FRANZ¹⁶⁾ sowie AUTERHOFF, GRAF und Mitarbeitern¹⁾ konnte bei den bisher angewandten Trennmethode n zum pc- und dc-Nachweis von Aloeinhaltsstoffen keine Auftrennung der Aloine erhalten werden. Die entsprechende Auftrennung war danach nur durch den Einsatz der HPLC-Technik möglich gewesen.

Eine Differenzierung der diastereomeren Aloine A und B sowie der diastereomere 7-Hydroxyaloine A und B untereinander gelingt interessanterweise auch über die Beobachtung der Fluoreszenzfarben: unmittelbar nach Besprühen des Chromatogramms ohne Erhitzen, fluoreszieren Aloin A gelb, Aloin B gelbbraun,

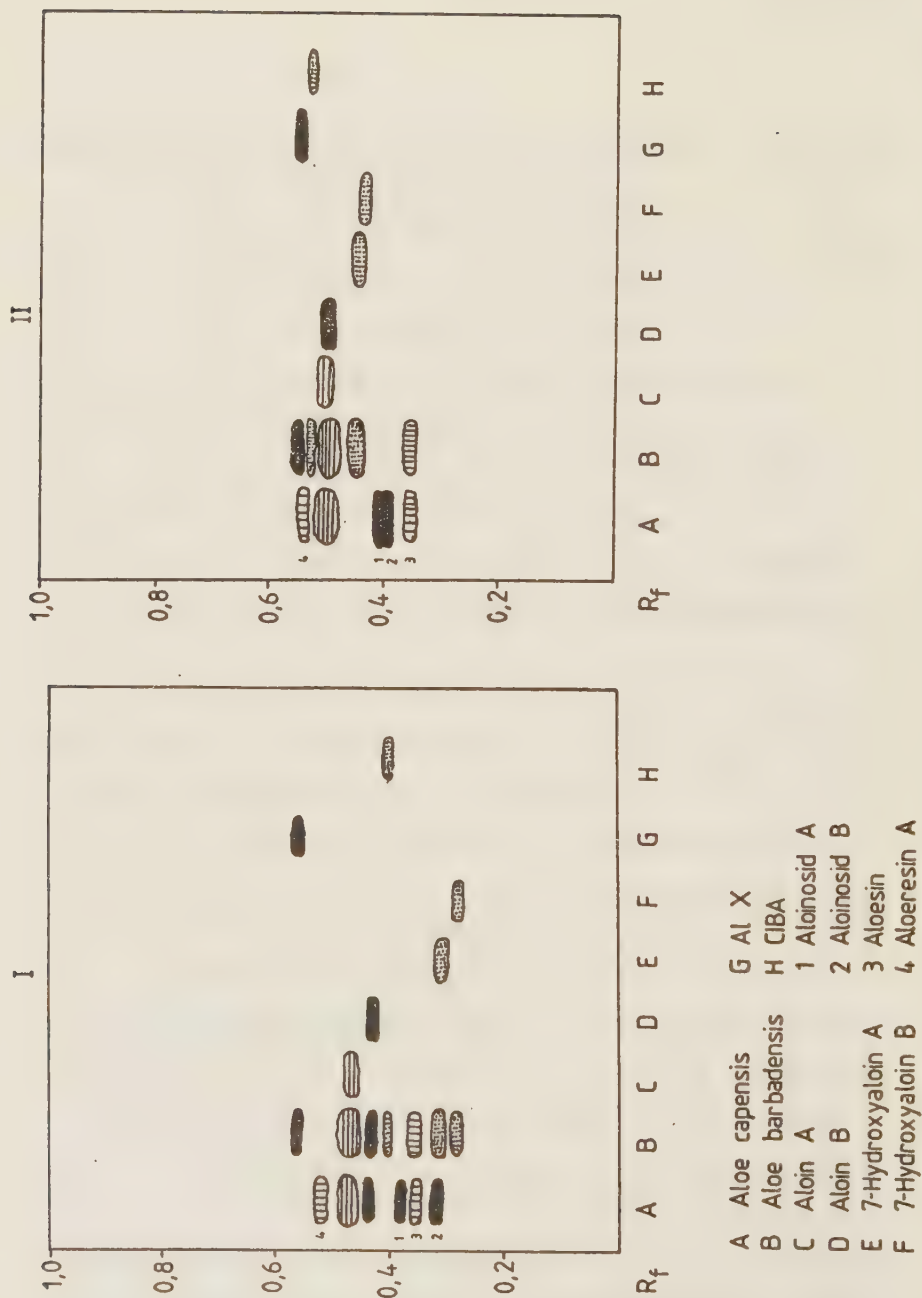


Abb. 2 : DC-Vergleich von *A. barbadensis* und *A. capensis*
(Ph. Eur. III), Bedingungen s. Text

Tabelle 3 : Übersicht über die Plattenreaktionen der Aloine und 7-Hydroxyaloin

Die Beobachtung der Fluoreszenzfarben erfolgt nach Entwicklung der Platten in den Fließmitteln Ethylacetat : Methanol : Wasser 100 : 17 : 13 (FM 1) und Chloroform : Methanol : Wasser : Ameisensäure 7 : 13 : 8 : 0,1 Uph. (FM 2). Die Platten wurden nicht erhitzt.

		<u>Tageslicht</u>		<u>UV 366 nm</u>	
Detektion	KOH	Echtblausalz	Naturst.R.	KOH	Naturs.R.
Aloin	gelb	grün	gelb	gelb	gelb
FM 1					
7-OH-Aloin	violett	violett	orange	blau	braun
Aloin A	gelb	dunkelgrün	gelb	gelb	gelb
Aloin B	gelb	grün	gelb	braun	gelb
FM 2					
7-OH-Aloin A	violett	blauviolett	orange ⁺	blau	braun
7-OH-Aloin B	violett	rotviolett	rot	violett	violett

⁺ Schnell in violett übergehend

7-Hydroxyaloin A blau und 7-Hydroxyaloin B violett.

Mit unserer dünn-schichtchromatographischen Methoden stand somit eine einfache, kostengünstige und wenig zeitaufwendige analytische Methode zur Verfügung, die sich insbesondere bei den Isolierungsarbeiten durch Mehrfachkristallisation und mittels Droplet Countercurrent Chromatography bewährt hat.

2.2. Isolierung

Die vielfachen Bemühungen zur Klärung der chemischen Natur des "Isobarbaloins" aus *Aloe barbadensis* sind hauptsächlich daran gescheitert, daß es nicht gelungen war, "Isobarbaloin" als zwei Verbindungen zu identifizieren und rein darzustellen (vgl. 1.2.4.).

2.2.1. Isolierungsschema

Basierend auf den in 1.4. dargelegten Ausführungen wurde das in Abb. 3 wiedergegebene Isolierungsschema erstellt. Die Entfernung der Harzanteile und Anreicherung der C-Glykoside fußen auf der Aceton/Isobutanol-Methode von EDER und ZINN. Anschließend wurden die 7-Hydroxyaloine und Aloine durch Mehrfachkristallisationen aus Methanol und ascorbinsäurehaltigem Wasser weiter angereichert. Dabei bestanden die Kristallisate aus Aloin A und 7-Hydroxyaloin A, während die Mutterlaugen überwiegend die B-Diastereomeren neben den A-Diastereomeren enthielten. Die Reindarstellung sämtlicher Diastereomeren erfolgte anschließend durch Droplet-Countercurrent-Chromatography.

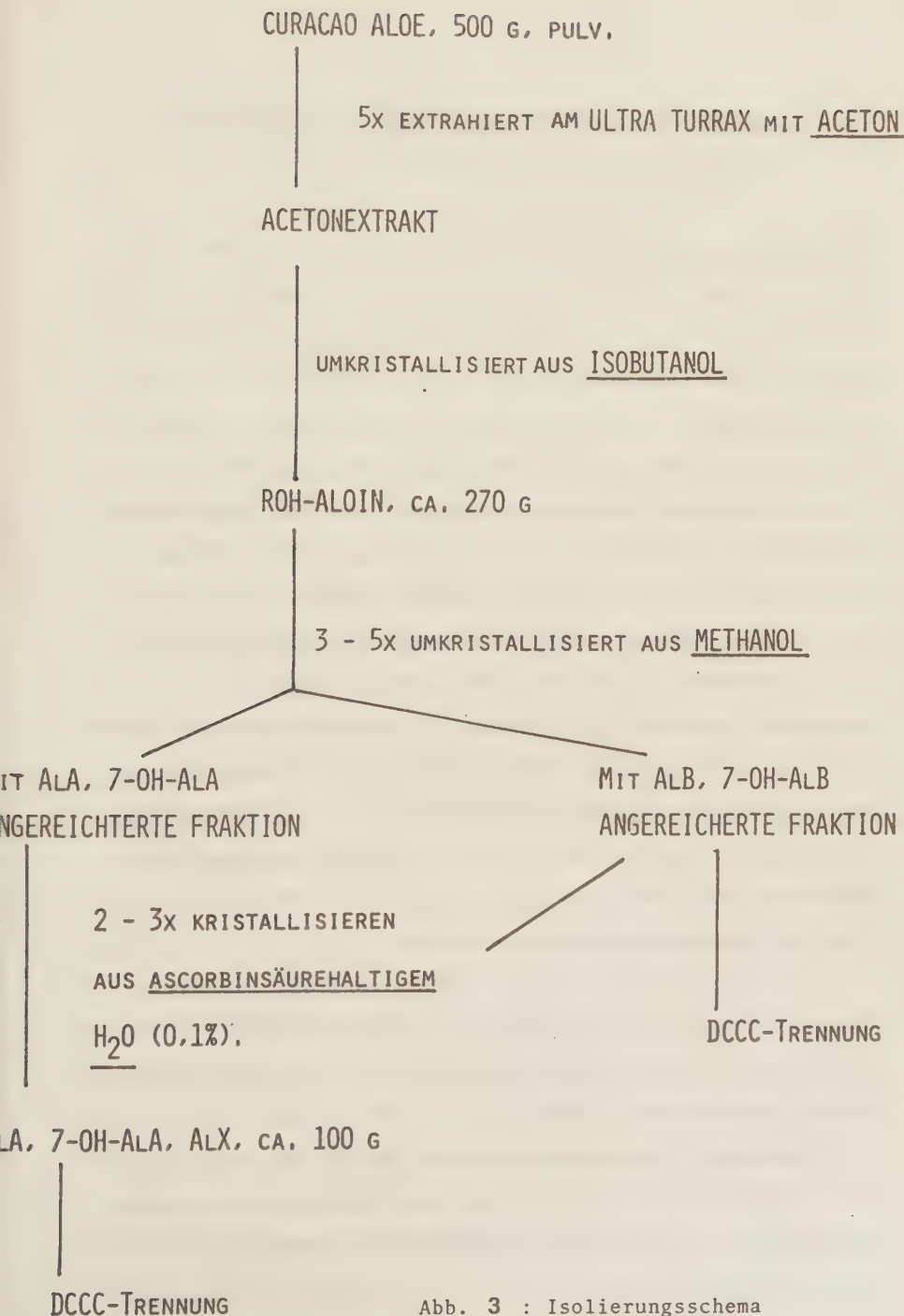


Abb. 3 : Isolierungsschema

2.2.2. Anreicherung von 7-Hydroxyaloin und Aloin durch die Aceton/Isobutanol-Methode

Zur Isolierung wurde die Droge mehrmals mit Aceton am Ultra Turrax extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden auf die Hälfte ihres Volumens eingeeengt und 12 Stunden im Kühlschrank stehengelassen. Von der braunen Abscheidung wurde abfiltriert, die klare Lösung bis zur Sirupdicke eingeeengt und das Volumen mit Isobutanol verdoppelt. Die Lösung wurde über Nacht in den Kühlschrank gestellt, das ausgefallene Rohaloin abgenutscht, mit eiskaltem Isobutanol nachgewaschen und bei Hochvakuum in der Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Nach Mehrfachkristallisation aus Methanol und anschließender Kristallisation aus ascorbinsäurehaltigem Wasser wurde ein in Nadeln kristallisierendes Aloin erhalten, dessen Schmelzpunkt keine Depression gegenüber dem handelsüblichen Aloins (Aloin Rotipuran) zeigte. Dünnschichtchromatographisch (s. 2.1.2.) erwies es sich als ein Gemisch, das hauptsächlich aus Aloin A neben wenig 7-Hydroxyaloin A und einer Substanz mit aloinähnlicher Fluoreszenz (Laborbezeichnung AlX) bestand.

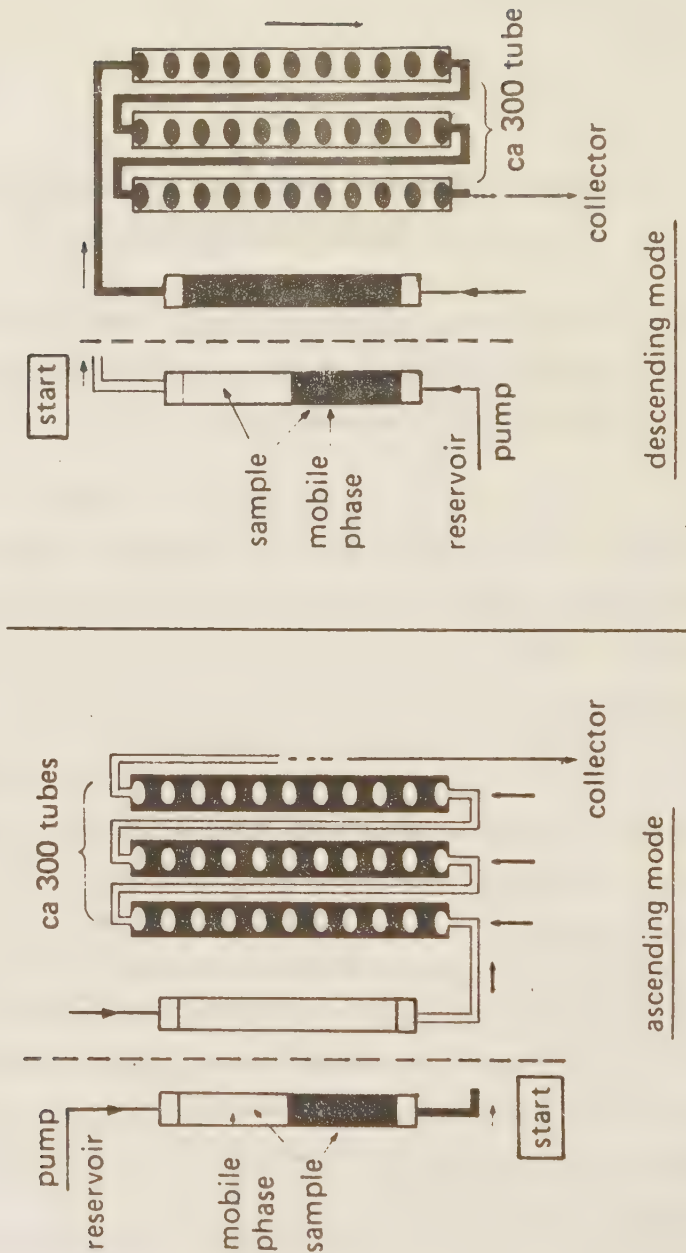
Die methanolischen Mutterlaugen stellten ein komplexes Gemisch aller, nach oben beschriebener Vorbehandlung in der Droge zufindenden Inhaltsstoffe, jedoch mit starker Anreicherung des Aloins B und des 7-Hydroxyaloins B dar. In den gefriergetrockneten, wäßrigen Mutterlaugen befanden sich neben geringen Mengen Aloin A, 7-Hydroxyaloin A und Aloesin hauptsächlich Aloin B und 7-Hydroxyaloin B.

2.2.3. Einsatz der Droplet Countercurrent Chromatography (DCCC) zur Isolierung der 7-Hydroxyaloine

2.2.3.1. Allgemeine Bemerkungen zur Droplet Countercurrent Chromatography (DCCC) und ihrer Anwendung in der Isolierung von Anthraderivaten

Die Droplet Countercurrent Chromatography, zu deutsch Tropfen Gegenstrom Chromatographie, gehört zu den modernen flüssig-flüssig-Gegenstrom-Chromatographieverfahren. Erst seit 1978 ist eine in Japan entwickelte Apparatur kommerziell erhältlich. In einigen grundlegenden Bemerkungen sei im folgenden die Trenntechnik vorgestellt: Bei der DCCC handelt es sich um eine reine Verteilungschromatographie, wobei die Trennung der Substanzen zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Lösungsmittelgemischen unterschiedlicher Dichte beruht. Die Trennung der Substanzen erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten und basiert auf einer Verteilung der Probe zwischen einem Strom von Tropfen mobiler Phase und einer in Säulen gefüllten stationären Phase. Insbesondere die Grenzflächen-Spannung darf einen bestimmten Grenzwert nicht überschreiten, damit es zur Tropfenbildung kommen kann ⁴⁵⁾. Abb. 4 zeigt die schematische Darstellung des Prinzips der DCCC. Die DCCC-Apparatur besteht aus vertikal angeordneten Glassäulen, deren oberes Ende mit dem unteren der nächsten durch einen dünnen Teflonschlauch verbunden ist. Säulenzahl und -durchmesser sind, dem jeweiligen Trennproblem angemessen, variabel. Die Säulen werden mit der stationären Phase gefüllt. Aus einem Reservoir wird

Flow diagram for DCCC operation



die mobile Phase in die Probenkammer gepumpt, in der die Probe zwischen den beiden Phasen verteilt ist, und dem unteren Ende (= ascending flow, d.h. die mobile Phase hat eine geringere Dichte) oder dem oberen Ende (= descending flow, d.h. die mobile Phase hat eine höhere Dichte) der ersten Säule zugeführt. Nachdem die Tropfen die stationäre Phase durchströmt haben, sammeln sie sich vor dem Säulenende und gelangen durch den Teflonschlauch in die nächste Säule. Zwischen letzter Säule und Fraktionssammler sind in unserem Labor ein UV-Detektor und Schreiber geschaltet, so daß der Originalelutionsverlauf als Transmissions- und Extinktionskurve aufgezeichnet werden kann, während in der Literatur bisher schematische Trennbilder angegeben sind.

Gegenüber der herkömmlichen Säulenchromatographie bietet die DCCC die Vorteile eines geringen Lösungsmittelverbrauchs und des Fehlens von Trägermaterial, das oft, besonders bei chemisch labilen Substanzen, wie sie Anthronglukosyle darstellen, irreversible Adsorptionen und Zersetzung verursacht. Zudem kann eingesetztes Probenmaterial quantitativ zurückgewonnen werden. Bis zum Zeitpunkt des Beginns der vorliegenden Untersuchung lag für die Verbindungsklasse der pflanzlichen Anthraderivate lediglich ein Applikationsbeispiel für die Trennung von Dianthronglykosiden vor ⁴¹⁾. Dabei handelte es sich jedoch nicht um eine Stoffisolierung, sondern um die "small-scale-determination" einer Probenmischung von je 3 mg der Sennoside A, B und C, von denen die stereoisomeren A und B getrennt wurden, A und C jedoch identische Retentionszeiten aufwiesen. In unserem Arbeitskreis war

eine präparative Trennung der diastereomeren Aloine durchgeführt worden ⁴²⁾, bei der erstmals für Naturstoffe vom Alointyp die DCCC-Technik eingesetzt wurde und die die Grundlage der im folgenden beschriebenen Isolierung des "Isobarbaloins" bildet.

2.2.3.2. Reindarstellung der 7-Hydroxyaloine

Die mögliche Eignung des Lösungsmittelsystems CHCl_3 : MeOH : H_2O : HCOOH 7 : 13 : 8 : 0,1 zur Darstellung der 7-Hydroxyaloine ließ sich von dem dc Vorversuch mit der organischen Phase dieses Systems (vgl. 2.1.2.) ableiten, denn entsprechend der Aloin-Trennung ⁴²⁾ wurden in diesem System ebenfalls die 7-Hydroxyaloine aufgetrennt (7-Hydroxyaloin A: R_f 0,36; 7-Hydroxyaloin B: R_f 0,32). Zur Optimierung der DCCC-Bedingungen für die 7-Hydroxyaloine erwies sich die von RAUWALD praktizierte Zugabe von Ameisensäure ⁴⁴⁾ zum Fließmittelsystem als unerlässlich zu Gunsten einer erheblich verbesserten Stabilität der Lösungen. Zudem dürfte die Zurückdrängung der Eigen dissoziation eine Erhöhung der Löslichkeit der vinylogenen Carbonsäuren in der organischen Phase des Lösungsmittelgemisches bewirken. Diese Aussage bedarf allerdings noch einer genauen experimentellen Untersuchung. Die Verwendung der Ameisensäure findet ihre Parallele in der Verwendung der reduzierend wirkenden Ascorbinsäure bei der Darstellung von Aloin durch Verteilungschromatographie mittels des Craig'schen Verteilungsapparates nach BÖHME und Mitarb. ⁴⁾. Gegenüber der Ascorbinsäure bietet die Ameisensäure jedoch den Vorteil der einfacheren

Aufarbeitung der Proben: sie hat einen Siedepunkt, der mit $100,5^{\circ}\text{C}$ etwa dem von Wasser entspricht. Tatsächlich wurde in einem Vorversuch, bei dem 20 mg des nach 2.2.2. erhaltenen Kristallisats in 10 ml des Fließmittelgemisches mit und ohne Zusatz von 0,1% Ameisensäure gelöst und 24 Std. dem Tageslicht ausgesetzt wurden, gefunden, daß die oxidative Zersetzung der 7-Hydroxyaloin durch den Zusatz der Ameisensäure verhindert wird. Bereits an der unterschiedlichen Färbung der wäßrigen Oberphasen war abzusehen, daß die Ameisensäure eine Zersetzung der 7-Hydroxyaloin zu rot gefärbten Oxidationsprodukten verhindert hatte. Diese mit bloßem Auge gemachten Beobachtungen wurden dc bestätigt. Die hohe Selektivität der DCCC bei der Trennung von Inhaltsstoffen der Curacao-Aloe im o.a. Fließmittelsystem belegen sowohl die Trennversuche nach aufsteigendem (mobile Phase = wäßrige Phase) als auch nach absteigendem Arbeitsmodus (mobile Phase = Chloroformphase). Nach beiden Verfahren konnte 7-Hydroxyaloin A von den Begleitstoffen abgetrennt werden. Gegenüber dem aufsteigenden Arbeitsmodus bot der absteigende den Vorteil der einfacheren Aufarbeitung der Proben. Konnte nach Chromatographie mit der wäßrigen Phase 7-Hydroxyaloin A nur gewonnen werden, indem die vom organischen Lösungsmittel befreite wäßrige Phase gefriergetrocknet wurde, so lieferte die Chromatographie mit der Chloroform-Phase die Reinsubstanz nach vorsichtigem Eindampfen der organischen Phase i.V. bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß: aus dem verbleibenden geringen Rest an ameisensäurehaltigen Wasser kristallisierte 7-Hydroxyaloin A in goldgelben Kristallnadeln

vom Schmelzpunkt $156 - 7^{\circ}$ C. Die hohe Selektivität der DCCC beim absteigenden Arbeitsmodus gestattete dabei die Verringerung eingesetzter Säulen auf 150 und das Aufgeben von über 2 g Probe. Diese experimentellen Daten sind in der Literatur zur DCCC-Methodik bisher nicht beschrieben. Trenndauer und Verbrauch an Lösungsmitteln haben sowohl nach aufsteigendem als auch nach absteigendem Arbeitsmodus in einem ähnlichen Bereich. Im übrigen fällt bei dieser Isolierungsmethode Aloin A in relativ hohen Ausbeuten an. Abb. 5 gibt die DCCC-Bedingungen und Elutionskurve nach Chromatographie mit der wäßrigen, Abb. 6 die entsprechenden Daten nach Chromatographie mit der Chloroformphase wieder.

Erhöhte Anforderungen an die Trennleistung des DCCC-Systems stellte wegen ihrer komplexen Zusammensetzung die Aufarbeitung der eingedampften bzw. gefriergetrockneten Mutterlaugen mit den in ihnen angereicherten Substanzen Aloin B und 7-Hydroxyaloin B. Denn neben diesen Verbindungen fanden sich noch die korrespondierenden A-Diastereomeren, Aloesin und Begleitstoffe unbekannter Struktur. Insbesondere die Abtrennung der polareren Verbindungen vom 7-Hydroxyaloin B, die dc kleinere R_f -Werte aufweisen, erwies sich als problematisch. Eine Optimierung brachte hier die Erhöhung der Polarität der organischen mobilen Phase durch den Zusatz von Isopropanol zum Fließmittelgemisch ⁴⁴⁾. Die günstigen Voraussetzungen zur Anwendung dieses Fließmittelgemisches ließen sich wiederum aus dem dc Vorversuch ableiten, bei dem die Aloine und die 7-Hydroxyaloine neben den erwarteten höheren R_f -Werten (7-Hydroxy-

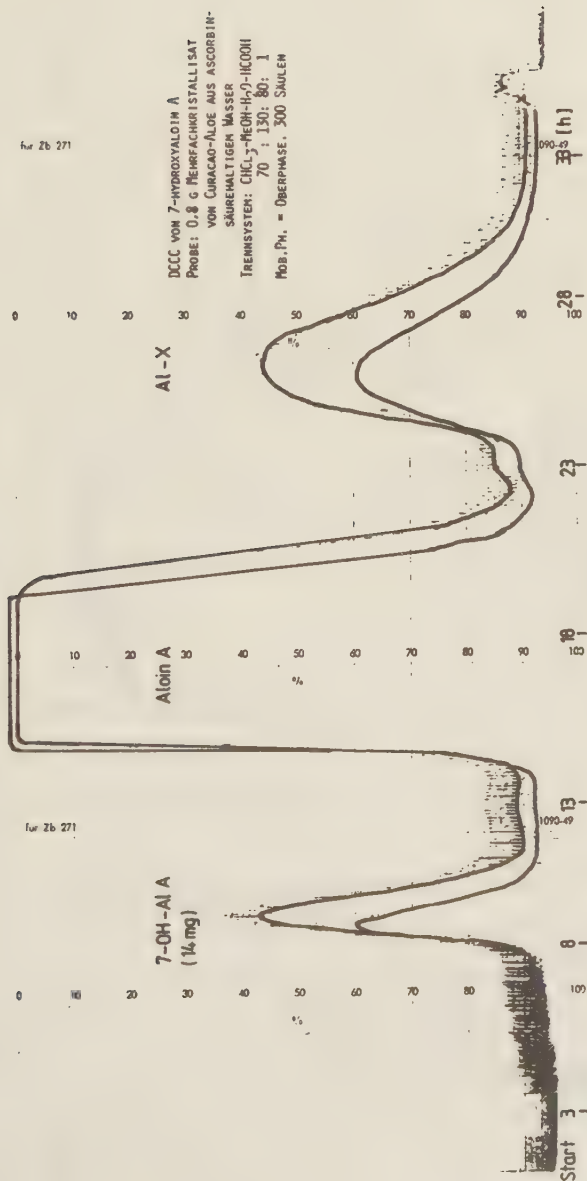


Abb. 5 : Original-Elutionskurve der Isolierung von 7-Hydroxyaloin A nach aufsteigendem Arbeitsmodus, Bedingungen s.o.

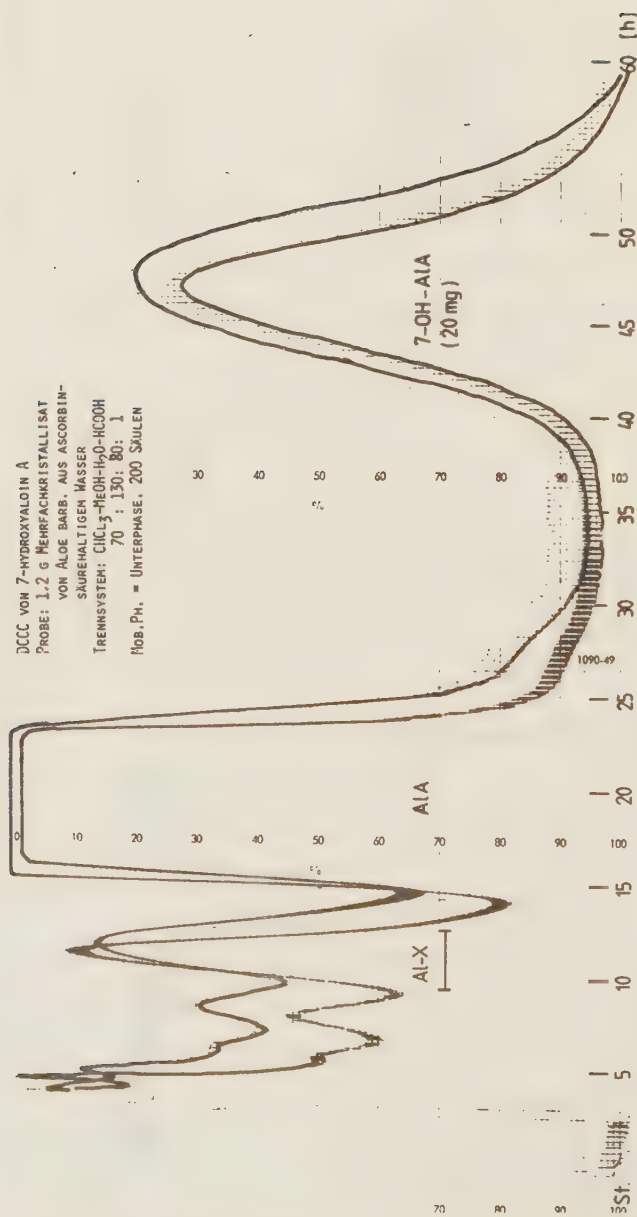


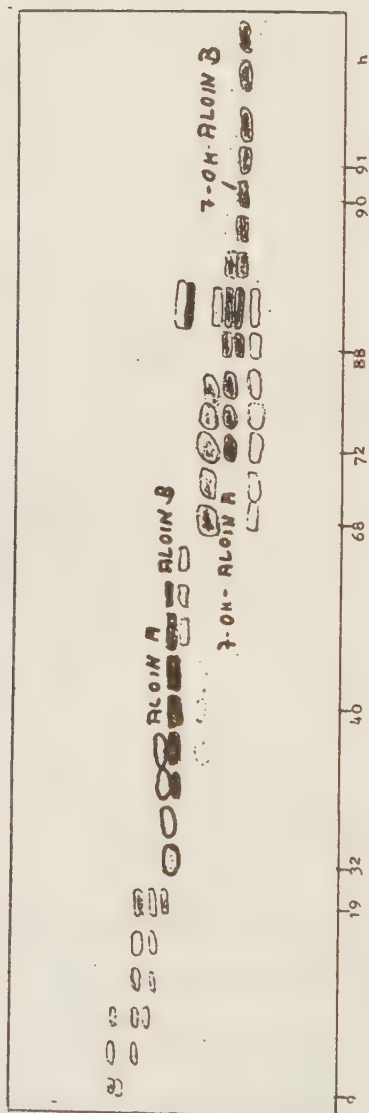
Abb. 6 : Original-Elutionskurve der Isolierung von 7-Hydroxyaloin A nach absteigendem Arbeitsmodus, Bedingungen s.o.

aloin A: R_f 0,52; 7-Hydroxyaloin B: R_f 0,49) sauber voneinander getrennt wurden. Trotzdem mußte, sofern die methanolischen Mutterlaugen aufgearbeitet wurden, das 7-Hydroxyaloin B von den polareren Begleitsubstanzen mittels einmaliger präparativer DC abgetrennt und über DCCC nochmals gereinigt werden; da es analog dem Aloin B nicht kristallisierte, wurde es aus dem vom organischen Lösungsmittel befreiten Ameisensäurehaltigen Wasser nach Gefriertrocknung als dunkelgelbe Kristallnadelchen vom Schmelzpunkt $149 - 151^{\circ} \text{C}$ erhalten. Bei einer Trenndauer von 92 Std. lieferte dieses Fließmittelsystem alle 4 Diastereomeren der Aloine und 7-Hydroxyaloine in zur Strukturuntersuchung ausreichenden Mengen. Dünnschichtchromatographische Verfolgung der DCCC-Elution und genaue Bedingungen der präparativen Isolierung sind der Abb. 7 zu entnehmen.

2.2.4. Weitere Trennversuche

2.2.4.1. Säulenchromatographische Trennversuche

Säulenchromatographische Auftrennungen des durch Kristallisation (s. 2.2.2.) erhaltenen Substanzgemisches an Kieselgel (Elution mit Ethylacetat/Methanol Gemischen) und an Polyamid (Elution mit Wasser, anschließend Methanol und mit Methanol/Wasser Gemischen) blieben erfolglos. Breite violette Zonen auf den vollständig eluierten Säulen zeigten die Zersetzung von 7-OH-A1A an.



DCCC-ISOLIERUNG DES 7-HYDROXYALOIN B AUS ALOE BARBADENSIS (PH.EUR.III)
 Probe: 1,5 g gefriergetrocknete Mutterlagen der Mehrfachkristallisation
 von Aloe barbadensis aus ascorbinsäurehaltigem Wasser.

Trennsystem: CHCl_3 - MeOH - iso-PrOH - H_2O - HCOOH (10:10:1:6:0,1)
 Mobile Phase: organische Phase
 Fraktionierung: 18 ml/h

Abb. 7

2.2.4.2. Herstellung und Isolierung eines 7-Hydroxyaloinacetats

Zum Zeitpunkt des nachstehend beschriebenen Experiments wurde das "Isobarbaloin" noch als vermeintlich einheitlicher, phenolischer Inhaltsstoff aufgefaßt. Bei ihrem äußerst labilen Charakter erschien eine Derivatisierung in Form einer Peracetylverbindung angebracht. Die Peracetylierung des nach 2.2.2. erhaltenen Kristallisats ergab eine Fraktion, in der dünnschichtchromatographisch die beiden intensiv blau fluoreszierenden Hauptzonen der Aloin- und "Isobarbaloin"-acetate auffielen. Sie wurden anhand ihrer charakteristischen Fluoreszenzen sowie Färbung nach Besprühen mit HNO_3 25% und KOH identifiziert. Der Beginn der Zersetzung von 7-Hydroxyaloinacetat zeigt sich auf dem Dünnschichtchromatogramm erst nach mehrtägiger Lagerung bzw. längerem Erhitzen bei 105°C durch eine leichte Violettfärbung der entsprechenden Zone. Die säulenchromatographische Elution des peracetylierten Kristallisats an Kieselgel mit Chloroform und steigenden Anteilen Aceton ergab keine befriedigende Trennung der Hauptacetate von Aloin und 7-Hydroxyaloin. Erst mit der Low-Pressure-Liquid-Chromatography-Technik (LPLC) an Lichroprep Si 60 Fertigsäulen (Elution mit Cyclohexan/Chloroform, Erhöhung des Elutionsgradienten durch Acetonzugabe) konnte ein dc einheitliches 7-Hydroxyaloinacetat erhalten werden. Das gut analysierbare Massenspektrum der Verbindung war ein Beleg für deren Reinheit und konnte zur Absicherung der Struktur von 7-OH-AlA herangezogen werden (s. 2.3.5.).

2.3. Identifizierung des "Isobarbaloins" als Gemisch der diastereomeren 7-Hydroxyaloine und deren Struktur- aufklärung

Gemäß 2.2.3. wurden für "Isobarbaloin" zwei kristalline Verbindungen erhalten, deren Strukturaufklärung als diastereomere 7-Hydroxyaloine im folgenden beschrieben wird.

2.3.1. IR- und UV-Spektren

Die beiden isolierten Verbindungen zeigten identische IR- und UV-Spektren. Die IR- und UV-Spektren wiesen eine deutliche Ähnlichkeit mit den entsprechenden Daten der diastereomeren Aloine auf.

In den Abb. 8 und 9 sind die IR-Spektren von 7-Hydroxyaloin A und von Aloin A wiedergegeben. Im Gegensatz zu den Anthrachinonen des Emodintyps zeigen die Anthronglukosyle vom Alointyp nur eine Bande eines chelatisierenden Carbonyls bei 1635 cm^{-1} , die auf die Wasserstoffbrückenbindung zweier benachbarter Hydroxylgruppen zurückzuführen ist (vgl. Frangulaemodin 1680 cm^{-1} und 1620 cm^{-1})^{21, 23}). Zudem deutet die breite Chelatbande einer Hydroxylvalenzschwingung von $3100 - 3600\text{ cm}^{-1}$ auf das Vorliegen chelatisierender Hydroxylgruppen hin.

Abb. 10 zeigt vergleichsweise die UV-Spektren von 7-Hydroxyaloin A und Aloin A in Methanol, Abb. 11 die entsprechenden Spektren nach Zugabe von Magnesiumacetatlösung. In Tabelle 4 sind die UV-Daten einer Reihe von Glukosylen vom Aloin-

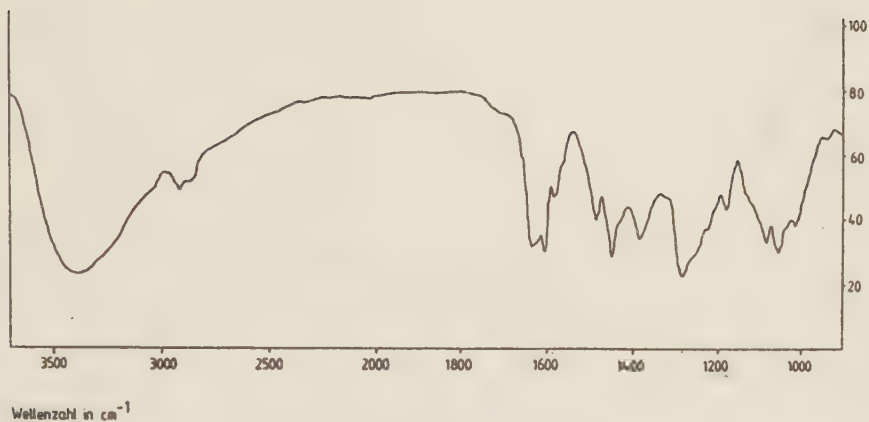


Abb. 8 : IR-Spektrum von 7-Hydroxyaloin A

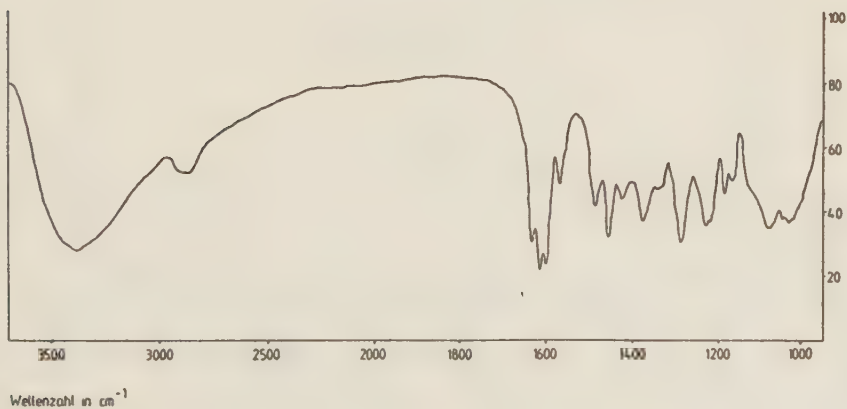


Abb. 9 : IR-Spektrum von Aloin A

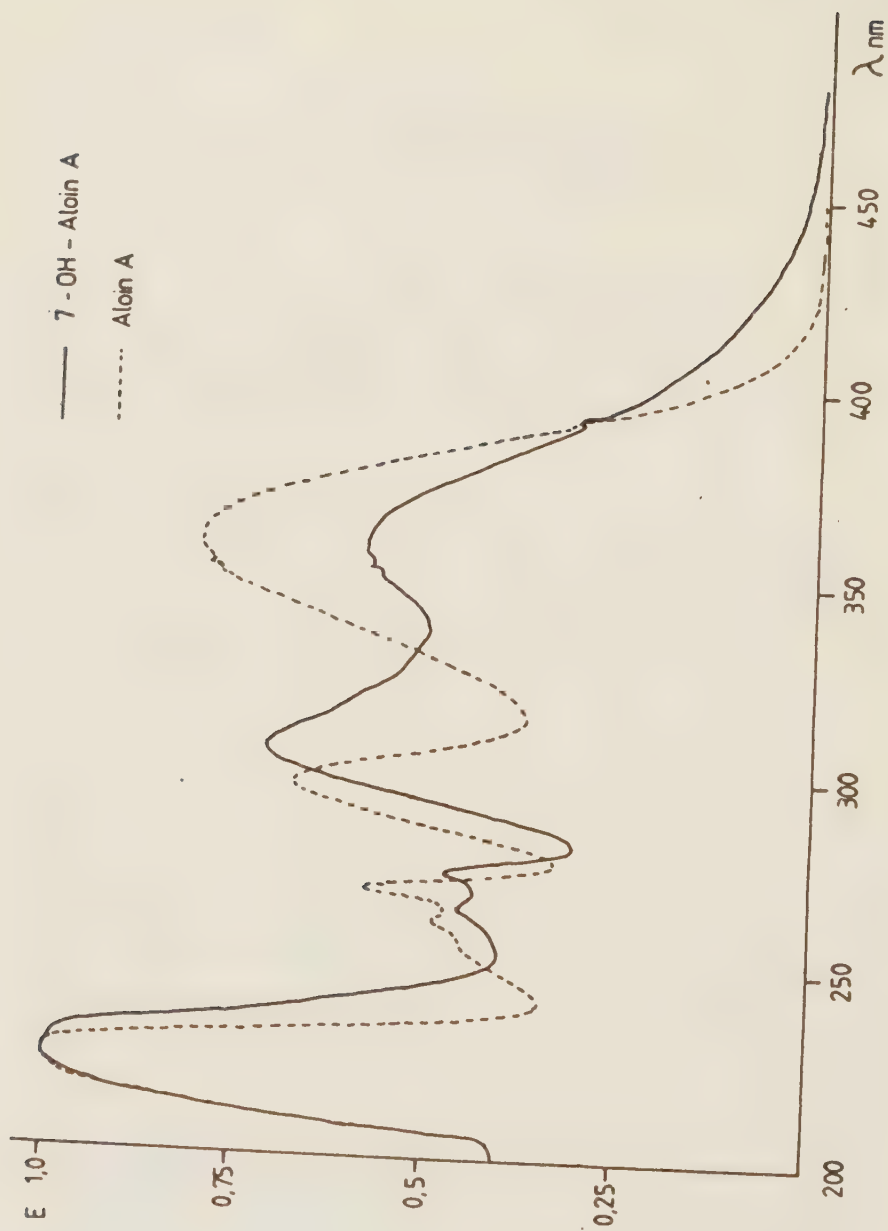


Abb. 10: Gegenüberstellung der UV-Spektren von 7-Hydroxyaloin A und Aloin A

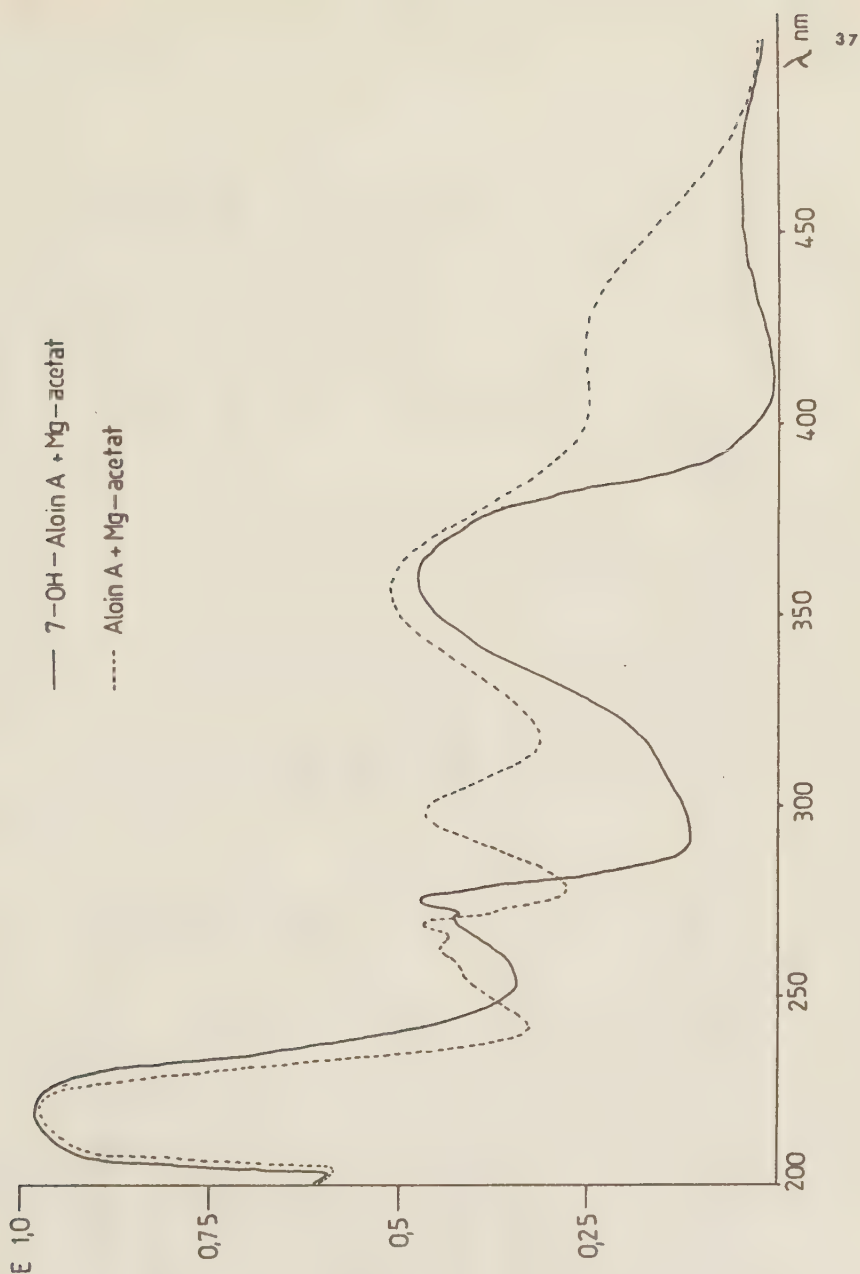


Abb. 11 : Gegenüberstellung der UV-Spektren von 7-Hydroxyalain A und Alain A nach Magnesiumacetat-Zugabe

Tabelle 4 : UV-Daten einiger Glukosyle vom Alointyp. Lösungsmittel: Methanol. Angegeben sind $\lambda_{\max}$ in nm.
 Spalten 1 - 3: Literaturangaben; Spalten 4 und 5: eigene Meßwerte.

1)	Homonataloin ²⁵⁾	223	250 (sh)	273	296	347
2)	4-Hydroxyaloin ¹³⁾		254 (sh) 263	270	292	352
3)	Barbaloin ²³⁾ (= Aloine A u. B)		252 260	268,5	295	358
4)	Aloine A und B	219	255 262	270	297	359
	" " + Mg-acetat	222	263	270	298	356
5)	7-Hydroxyaloin A u. B	227	265	274	307	358
	" " + Mg-acetat	227	270	275	304 (sh)	361
						419
						459

Typ zusammengestellt. Charakteristisch für Anthronderivate vom Aloin-Typ ist das Maximum bei ca. 350 - 360 nm, während 1,8-Dihydroxyanthrachinonderivate eine charakteristische langwellige Absorption bei 420 nm aufweisen. Der Tabelle und den Abbildungen ist zu entnehmen, daß die C-7-OH-Substitution eine bathochrome Verschiebung des Maximums von 297 (Aloin) nach 307 nm verursacht, die auch beim 4-Hydroxyaloin und Homonataloin nicht zu beobachten ist und ein 1,2- resp. 7,8-Dihydroxysubstitutionsmuster anzeigt. Dieses Strukturelement ist auch für die Reaktion mit Magnesiumacetatlösung zu einer tiefroten Färbung (vgl. Aloin: gelb) verantwortlich, wie insbesondere aus den entsprechenden Farbreaktionen des Homonataloins (gelb) und dessen 8-Desmethylprodukt (dunkelrot)²⁵⁾ zu entnehmen ist.

2.3.2 Oxidative Spaltung

Die oxidative Spaltung der 7-Hydroxyaloine A und B mit Eisen-(III)-chlorid und Salzsäure ergab für den Zuckeranteil analog dem Aloin den Hinweis auf eine Glukosylverbindung¹¹⁾, da dünnschichtchromatographisch Arabinose und Glukose nachgewiesen wurden.

Der Aglykonkomponente, die aus dem wäßrigen Reaktionsansatz mit CHCl_3 ausgeschüttelt wurde, konnte zwar eine violett gefärbte Zone deutlich unterhalb des Aloeemodins zugeordnet werden (vgl. Abb. 12), jedoch erwies sich die Verbindung nach Aufarbeitung als so instabil, daß eine

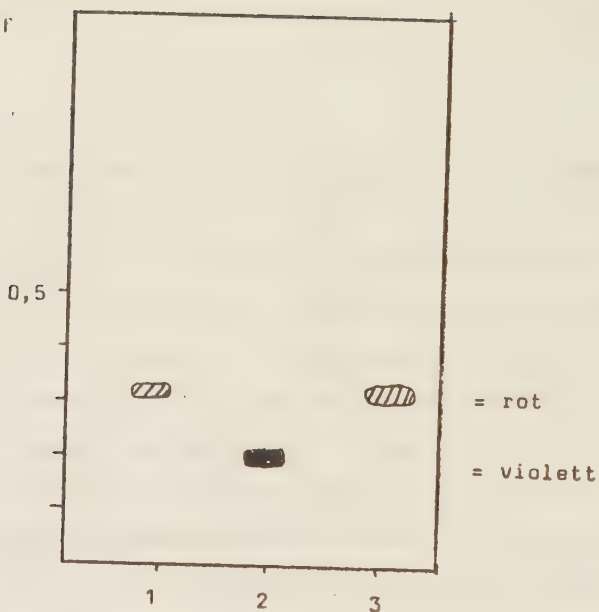


Abb. 12 : Nachweis von Aloeemodin und 7-Hydroxyaloeemodin mittels DC

1. Etherextrakt von Curacao-Aloe
2. Chloroformausschüttelung der Eisen(III)-chlorid-Spaltung
3. Tetrachlorkohlenstoffausschüttelung der Eisen(III)-chlorid-Spaltung

Fließmittel: Toluol-Ethylformiat-Ameisensäure
(75 : 24 : 1)

Detektion: Methanolische KOH

definitive Reindarstellung und Identifizierung nicht möglich war. Trotz schonenden Abdampfens des Chloroforms bei Raumtemperatur i.V. unter Lichtausschluß waren dc mehrere violett gefärbte Oxidationsprodukte nachweisbar. Weitere Angaben zur Isolierung der Aglykonkomponente sind dem Kap. 2.4. zu entnehmen.

2.3.3. EI- und FAB-Massenspektren

Beim elektronenstoßinduzierten Zerfall (70 eV) zeigen die beiden 7-Hydroxyaloine den gleichen, schwach ausgeprägten Molekülpeak bei m/z 434 (vgl. Aloin: 418) und gleiche Bruchstücke mit unterschiedlichen Intensitäten (s. Abb. **13** und **14**). Der Basispeak bei m/z 272 (vgl. Aloin: 256) entsteht durch die Abspaltung des Bruchstücks m/z 162, verursacht durch die Eliminierung von Glukose. Der ms Zerfall der 7-Hydroxyaloine entspricht im wesentlichen dem von PROX ⁴¹⁾ untersuchten MS des Aloins und ist in Abb. **15** als hypothetisches Schema wiedergegeben. Die von PROX angegebene Abspaltung des Bruchstücks $C_4H_8O_{12}$ (120 ME) aus dem Glukosylrest des Aloins ist bei den 7-Hydroxyaloinen nicht zu beobachten, da ein entsprechendes Fragment m/z 314 nicht auftritt. Bei der von GRAF und ALEXA ¹³⁾ beschriebenen Verbindung 4-Hydroxyaloin wurde dieses Ion ebenfalls nicht beobachtet, was von den Autoren auf eine veränderte Orientierung des Pyranosylrestes durch zusätzliche OH-Substitution am aromatischen System zurückgeführt wurde.

Zur Absicherung des Ergebnisses und zur eindeutigen Bestim-

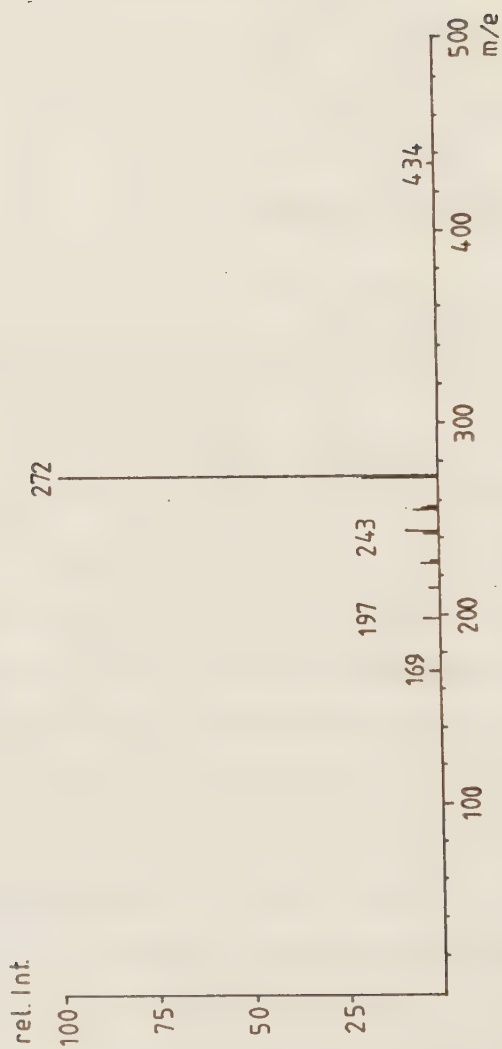


Abb. 13 : 70 eV EI-MS von 7-Hydroxyvaloin A

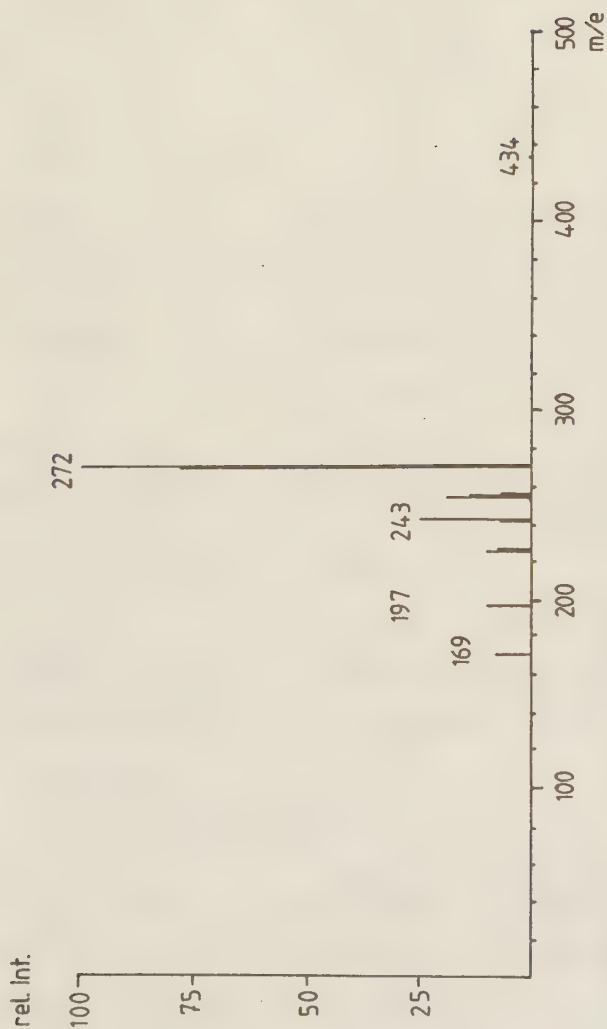


Abb.14 : 70 eV EI-MS von 7-Hydroxyvaloin B

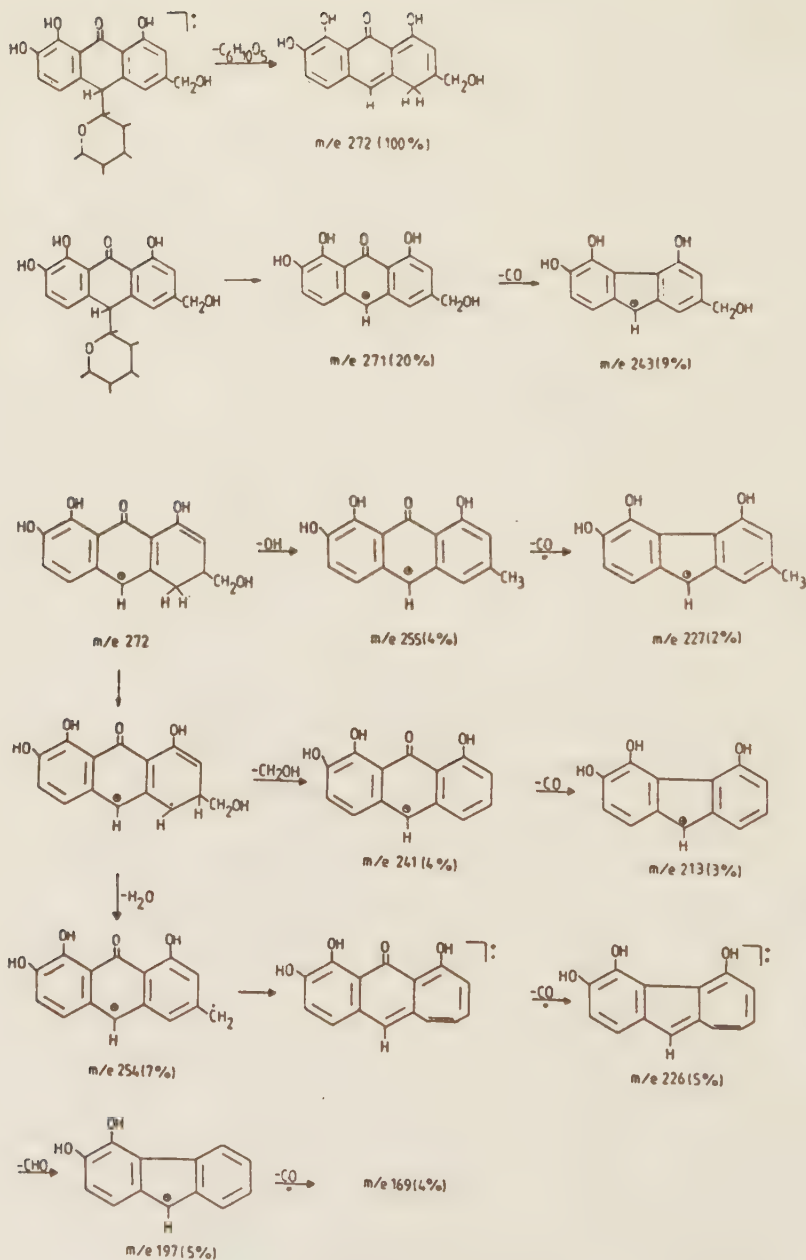


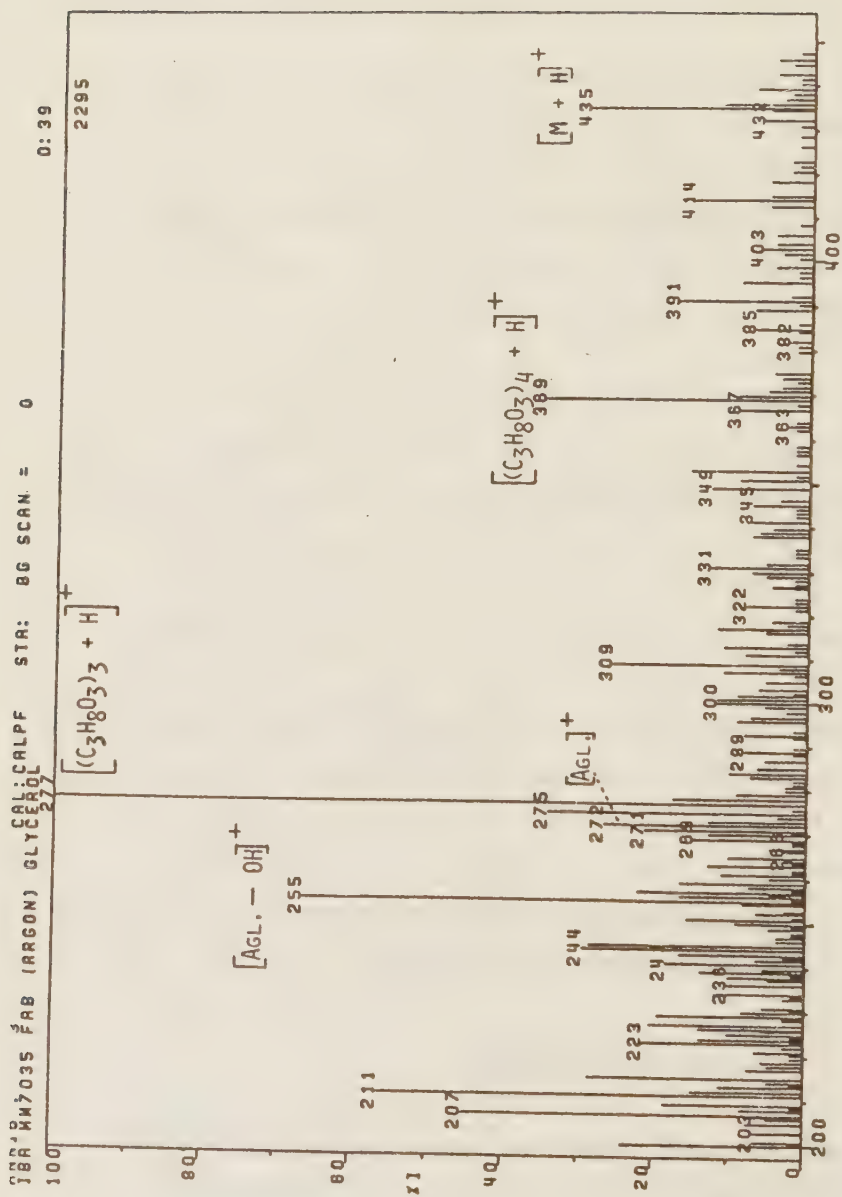
Abb. 15 : Hypothetisches Schema des ms Zerfalls von 7-Hydroxyaloin A (vgl. Lit. 41)

mung des Molekulargewichtes der relativ polaren, schwer flüchtigen und instabilen 7-Hydroxyaloin wurde die erst seit 1981 kommerziell erhältliche Meßtechnik der Fast-Atom-Bombardment-Massenspektrometrie eingesetzt, die zu den sogenannten "soft ionisation methods" zählt. Die Abb.16 und 17 zeigen die FAB-Massenspektren des 7-Hydroxyaloin A. In der Abb.16 sind die Peaks der Massen m/z 369 und 277 (basepeak) den Glycerin-Clusterionen zuzuordnen ($3 \times 92 + H^+$ und $4 \times 92 + H^+$). Im Clusterionfreien Spektrum (Abb.17) sind das protonierte Molekülion bei m/z 435 $(M + H)^+$ aufgrund der relativ hohen Intensität von 60% wie auch das wichtige Anthronsignal m/z 272 der Aglykonkomponente leicht zu identifizieren.

Die massenspektrometrische Hochauflösung in Verbindung mit der CH-Analyse bestätigt bei 7-Hydroxyaloin A (gef.: 434, 1211) und B (gef.: 434, 2153) den für $C_{21}H_{22}O_{10}$ berechneten Wert (ber.: 434, 3963) und ergibt das Vorliegen isomerer Verbindungen, die formal gegenüber Aloin ein zusätzliches Sauerstoffatom tragen.

2.3.4. 1H - und ^{13}C -NMR-Spektren

Die Abb. 18 und 19 zeigen die 250 MHz 1H -NMR-Spektren von 7-Hydroxyaloin A und B^{+) in DMSO- d_6 . Die gedehnten Resonanzbereiche der aromatischen Protonen und der Protonen im Bereich von $\delta = 5,45 - 3,98$ ppm von 7-Hydroxyaloin A sind in Abb.20 wiedergegeben. Die nach Zugabe einiger}



bb.16 : FAB-MS von 7-Hydroxyaloin A (Glycerin-Cluster)

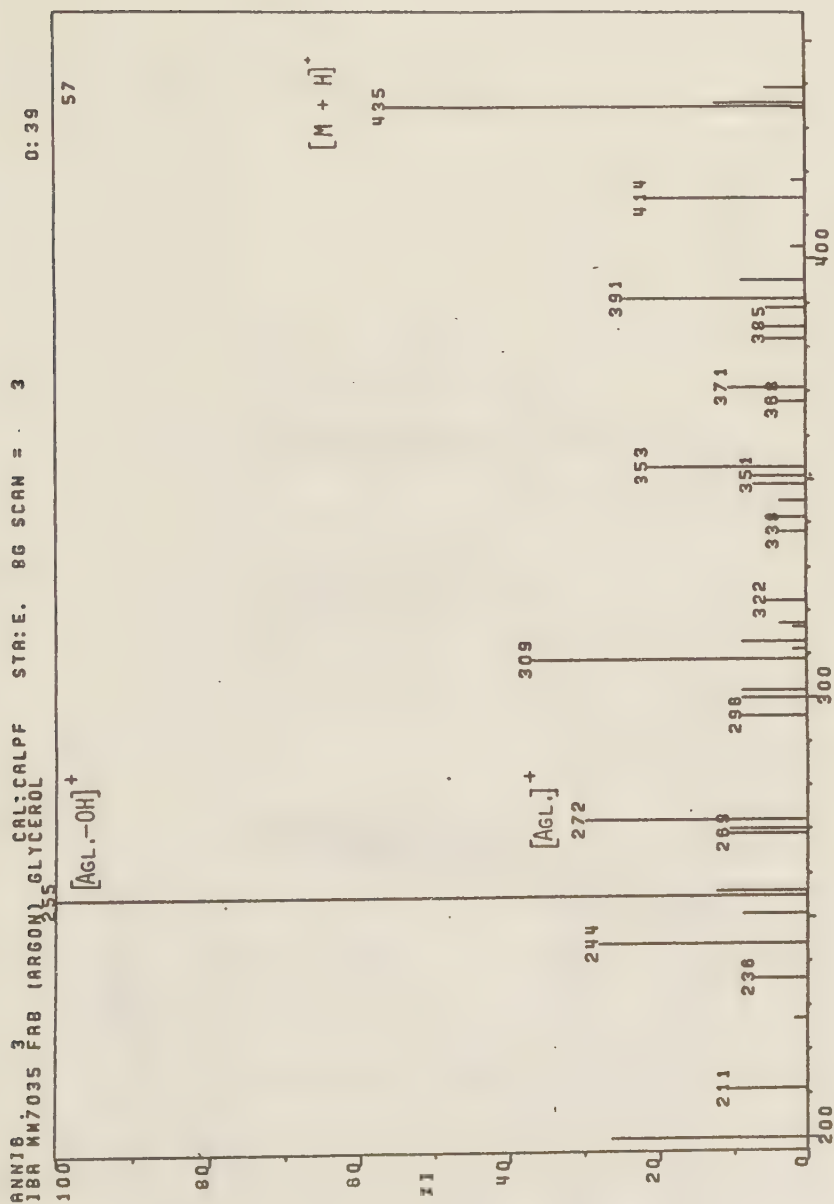


Abb. 17 : FAB-MS von 7-Hydroxyaloin A (ohne Glycerin-Cluster-Ionen)

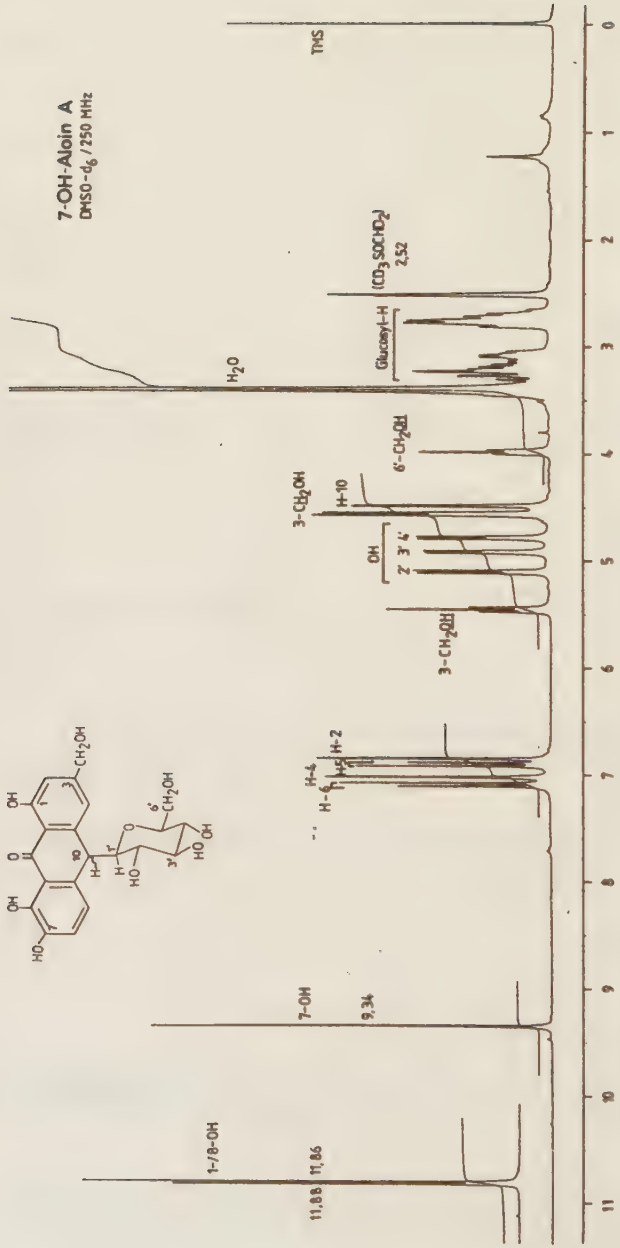


Abb. 18 : 250 MHz ¹H-NMR-Spektrum von 7-Hydroxyaloin A in DMSO d₆

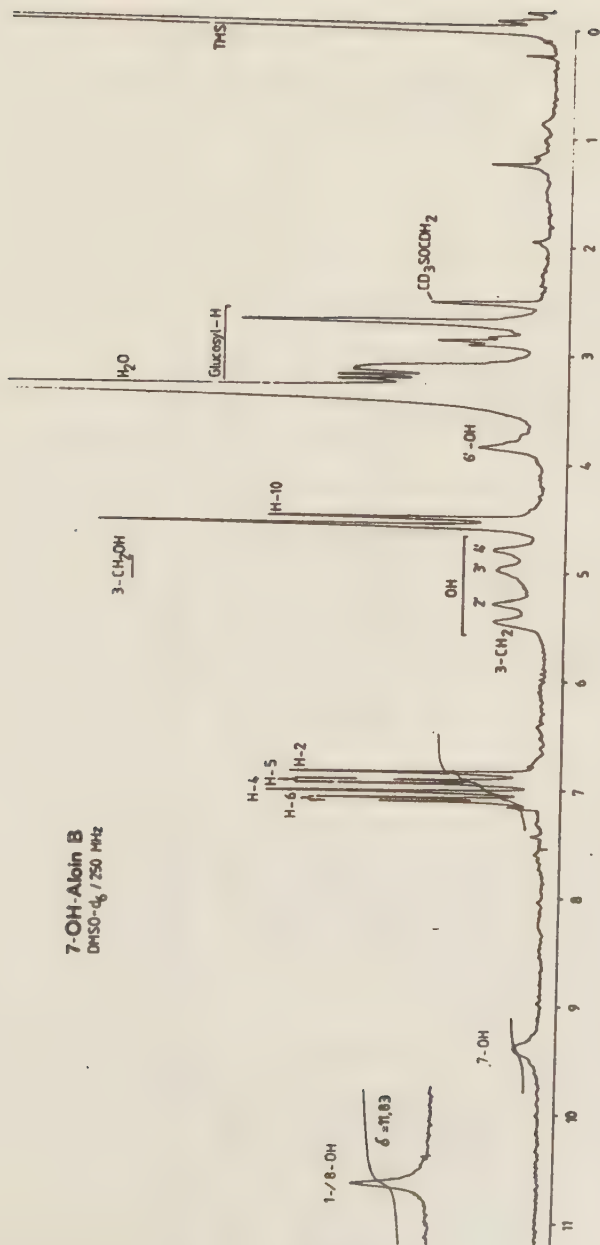


Abb. 19: 250 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 7-Hydroxyaloin B in DMSO d_6

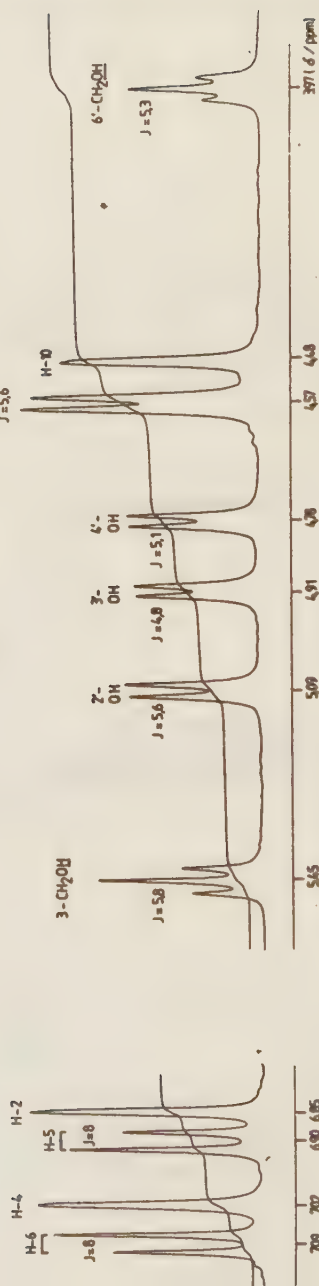
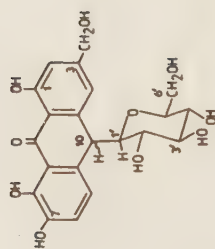


Abb. 20 : 250 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 7-Hydroxyalain A: Ausschnitt von 3,9-7,1 ppm (gedehnter Resonanzbereich, 10 Hz = 1 cm)

Tropfen deuterierter Trifluoressigsäure in DMSO- d_6 aufgenommenen Spektren sind in **21(A)** und **22(B)** abgebildet, aus denen die Gegenüberstellung der gedehnten Hochfeldbereiche $\delta = 3,45 - 2,68$ ppm in Abb. **23** wiedergegeben ist. Die ^1H -NMR chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sämtlicher Protonen der 7-Hydroxyaloine sind in Tab. **5** zusammengefaßt. Die eindeutige Zuordnung der Signale stützte sich auf die von RAUWALD und ROTH⁴⁶⁾ beschriebene ^1H -NMR Analyse der diastereomeren Aloine A und B. Der Tieffeldbereich im Spektrum von 7-Hydroxyaloin A zeigt die Protonenresonanzen für drei phenolische Hydroxylgruppen an: zwei chelatisierende Hydroxylgruppen (C-1- bzw. C-8-OH, $\delta = 11,88$ und $\delta 11,86$ ppm; s, je 1 H) sowie ein Signal für ein weiteres Hydroxyl bei $\delta = 9,34$ ppm (Austausch mittels CF_3COOD bzw. D_2O). Demnach sollte das gegenüber der Molmasse der Aloine zusätzliche Sauerstoffatom in Form

⁴⁾ Erheblich schwieriger gestaltete sich die Aufnahme eines auswertbaren ^1H -NMR-Spektrums des sehr labilen 7-Hydroxyaloins B. Bereits beim Lösen ging die anfänglich rötliche Färbung in violett über, ein Phänomen, das beim 7-Hydroxyaloin A erst mit einiger zeitlicher Verzögerung zu beobachten war und die Messung nicht beeinflusste. Eine relativ stabile Lösung wurde beim Ansäuern mit CF_3COOD erhalten, wobei sich die Substanz unter beständiger Gelbfärbung löste.

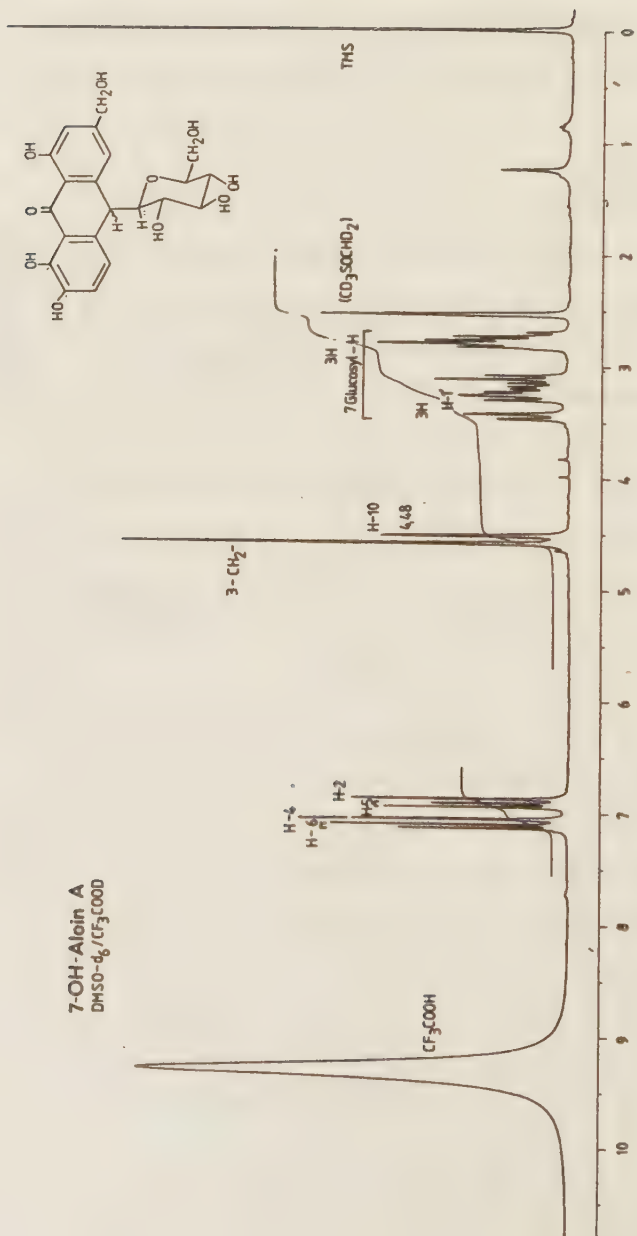


Abb. 21: 250 MHz ^1H -NMR-Spektrum von 7-Hydroxyaloin A in DMSO- d_6 nach CF $_3$ COOD-Austausch

7-OH-AI B
DMSO-d₆ / CF₃COOD

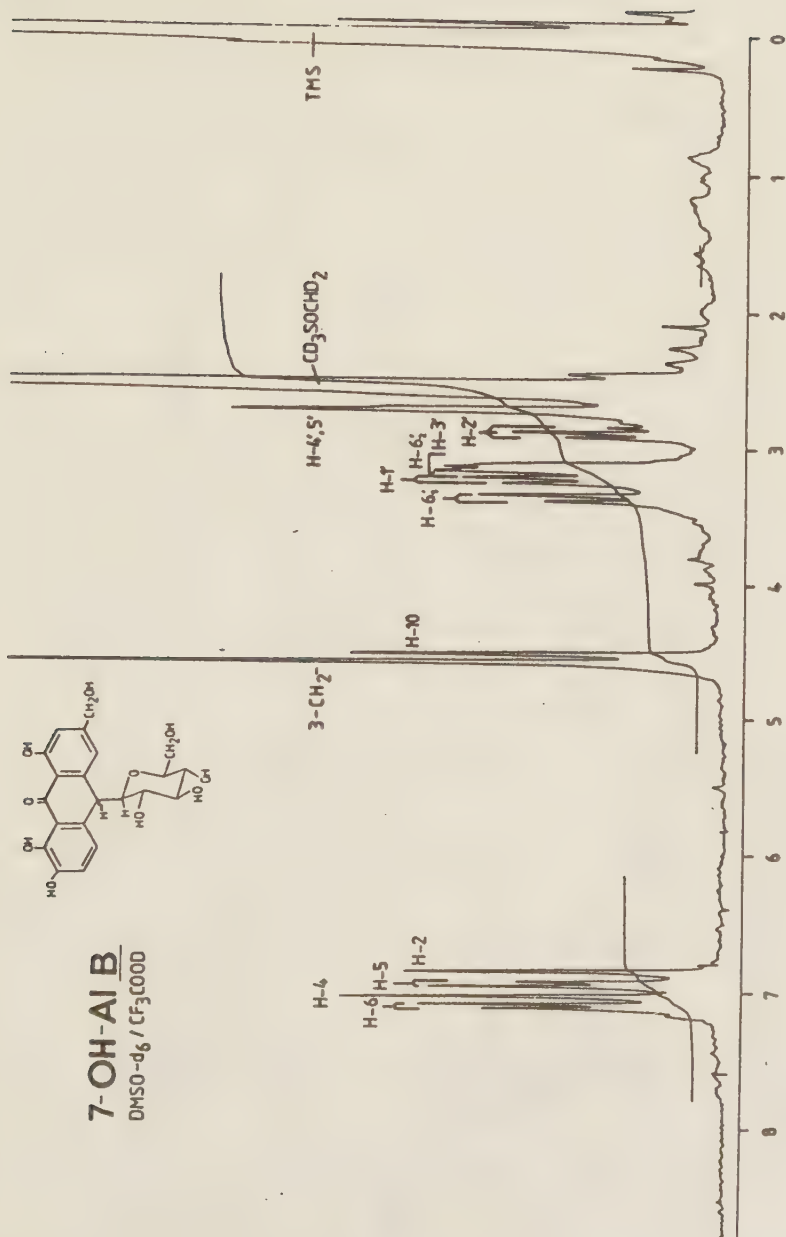
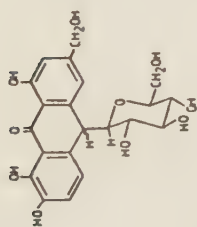


Abb. 22: 250 MHz ¹H-NMR-Spektrum von 7-Hydroxyaloin B in DMSO-d₆ nach CF₃COOD-Austausch

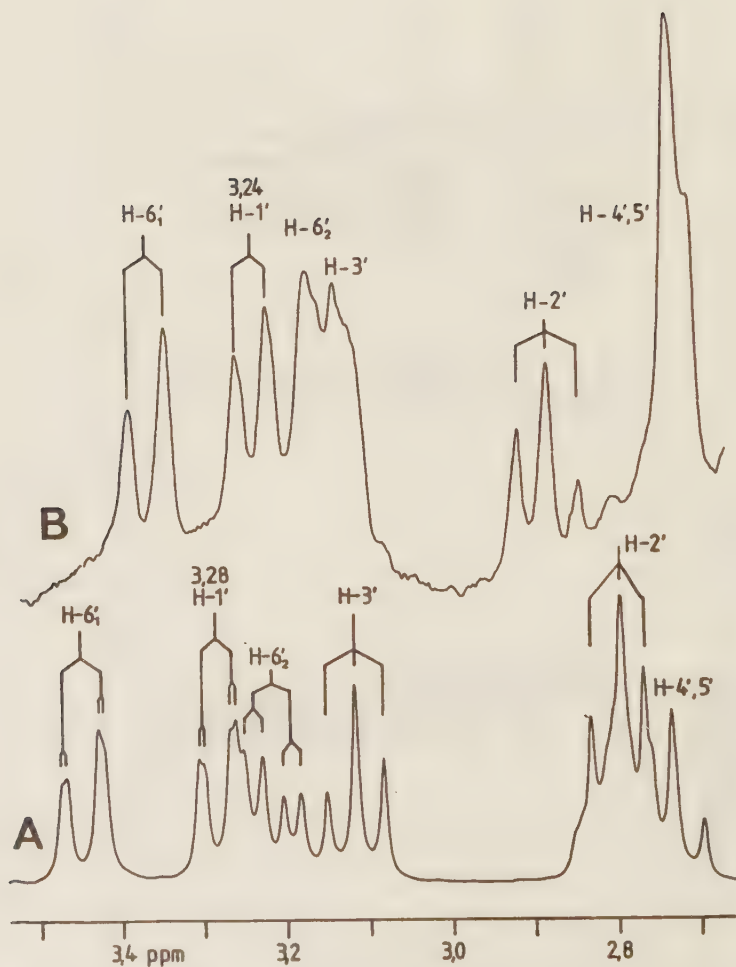


Abb. 23: Gegenüberstellung der Signale der Glukosylprotonen von 7-Hydroxyaloin A und B (s. Lit. 46)

Tabelle 5 : ^1H -NMR-Daten^{a)} der diastereomeren
7-Hydroxyaloin "A" und "B" in DMSO-d_6 .

	<u>7-Hydroxyaloin "A"</u>	<u>7-Hydroxyaloin "B"</u>
1-/8-	11,88 s	11,83 s, br
OH	11,86 s	11,83 s, br
7-OH	9,34 s	9,35 s
H-2	6,85 s, br	6,83 s, br
H-4	7,02 s, br	7,01 s, br
H-5	6,90 d (8)	6,92 d (8)
H-6	7,09 d (8)	7,09 d (8)
H-10	4,48 s, br	4,50 s, br
3- CH_2OH	4,57 d (5,6)	4,56 s, br
3- CH_2OH	5,45 t (5,8)	5,42 s, br
2'-OH	5,10 d (5,6)	5,26 s, br
3'-OH	4,91 d (4,8)	4,95 s, br
4'-OH	4,78 d (5,1)	4,77 s, br
6'-OH	3,98 t (5,3)	3,82 s, br
H-1', ^{b)}	3,28 dd (9,7;1,5)	3,24 d, br (9,7)
H-2'	2,79 dd (9,6;9)	2,87 t (9,7)
H-3'	3,10 t (9)	3,11-3,16 m
H-4'	2,68-2,74 m	2,70-2,80 m
H-5'	2,68-2,74 m	2,70-2,80 m
H-6' ₁	3,45 dd (11;1,5)	3,35 d, br (11)
H-6' ₁	3,21 dd (11;5)	3,11-3,16 m

a) δ (ppm) beziehen sich auf TMS als internem Standard.
In Klammern sind die Kopplungskonstanten in Hz angegeben.

b) Die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten der
Glukosylprotonen H-1' bis H-6' sind nach H/D-Austausch mit
Trifluoressigsäure bestimmt worden.

einer phenolischen Hydroxylgruppe vorliegen. Demzufolge integrierte der Bereich der aromatischen Protonenresonanzen für insgesamt 4 Protonen (vgl. Aloin: 5 Protonen). Von diesen stimmen die Daten der aromatischen Protonen H-2 und H-4 sowie der 3-Hydroxymethylgruppe mit den entsprechenden Signalen des Aloin A überein, so daß die Hydroxylsubstitution im Ring A erfolgt sein sollte. Dementsprechend sind dem A-Ring zwei Dubletts mit der Intensität für zwei aromatische Protonen zuzuordnen, deren Kopplungskonstante mit $J = 8 \text{ Hz}$ zwei vicinale Protonen nachweist. Diese könnten an C-6 und C-7 oder an C-5 und C-6 gebunden sein, so daß entweder eine C-5 oder eine C-7-Hydroxylierung vorliegen muß. Für eine Hydroxylierung an C-7 der Aloine spricht eine ca. 0,5 ppm Hochfeldverschiebung des H-6-Signals ($\delta = 7,09$) im Vergleich zum entsprechenden Signal im Aloin ($\delta = 7,57$) infolge des Inkrementeeinflusses eines orthoständigen Hydroxyls¹⁷⁾. Zudem zeigen die Signale des Anthron-H-10, des anomeren Protons und der 2'-OH-Gruppe gegenüber den entsprechenden des Aloins A nur unwesentliche Unterschiede, die im Meßfehlerbereich liegen, so daß die denkbare C-5 Hydroxylsubstitution ausgeschlossen werden kann. Diese Aussage steht im Einklang mit der in 2.7.1. dargelegten Interpretation der UV-Spektren. Die Daten der Aglykonkomponente des stereoisomeren 7-Hydroxyaloin B stimmen weitgehend mit denen für das A-Diastereomere besprochenen Signalen überein, so daß als Aglykonkomponente beider Verbindungen das 7-Hydroxyaloeemodinanthon vorliegen sollte.

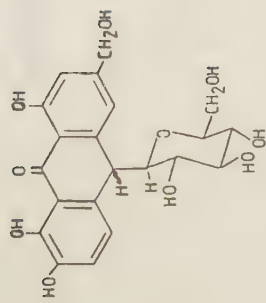
Die Protonenresonanzen der Glukosylreste der Aloine⁴⁶⁾ und 7-Hydroxyaloine verhalten sich völlig analog. Demnach besteht kein signifikanter Unterschied in den chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten zwischen den beiden diastereomeren 7-Hydroxyaloinen.

Für die Aloine war durch den Einsatz der NMR-Doppelresonanztechnik an der mit Trifluoressigsäure versetzten Lösung in unserem Arbeitskreis⁴⁶⁾ erstmals nachgewiesen worden, daß das Signal der anomeren Protonen nicht wie bei den O-Glykosiden und den aromatischen C-Glykosylen nach relativ tiefem Feld verschoben wird, sondern als Doppeldublett im Hochfeldbereich der übrigen Glukosylprotonen erscheint. Durch die Aufspaltung der H-1'-Signale mit $J_{H-1',-2'} = 9,6$ Hz wurde erstmalig spektroskopisch die β -Konfiguration des Glukopyranosylrestes in beiden Aloinen und somit in natürliches 10-Glukosylanthronderivates wiesen. Die übrigen Signale (incl. der Hydroxylprotonen) des Glukosylrestes wurden ebenfalls mit Hilfe der Doppelresonanztechnik zugeordnet.

Im Falle der 7-Hydroxyaloine erscheinen die Signale der anomeren Protonen entsprechend den Aloinen im gleichen Bereich wie die anderen Glukosylprotonen bei $\delta = 3,28$ ppm (A) und 3,24 ppm (B) mit den entsprechenden relativen Verschiebungsunterschieden von 0,04 ppm (vgl. Aloin A: 3,35 ppm; Aloin B: 3,31 ppm), wie die Gegenüberstellung der entsprechenden Resonanzbereiche in Abb. 23 zeigt. Die Kopplungskonstanten $J = 9,6$ bzw. 9,7 Hz der H-1'-Signale belegen die β -Konfiguration der Glukosylreste in beiden 7-Hydroxyaloinen. Die übrigen Glukosyl-Ring- und Hydroxylprotonen ließen sich in Anlehnung

an die Aloin-Analyse zwanglos zuordnen. Danach sind lediglich die Dubletts der 2'-OH-Protonen bei $\delta = 5,10$ ppm (A) und $\delta = 5,26$ ppm (B) mit einem relativen Verschiebungsunterschied von 0,16 ppm (vgl. Aloine 0,14 ppm) leicht zu unterscheiden.

Das ^{13}C -NMR-Spektrum³⁹⁾ des 7-Hydroxyaloin A (Abb. **24** und **25**, Tab. **6**) belegt das Vorliegen des Zuckers in der Pyranoseform: dies geht aus den Signallagen der Glukosylkohlenstoffe, insbesondere aus dem alleinigen Hochfeldsignal für C-6' hervor, das leicht anhand des Triplettts in der Off-Resonance-Aufnahme identifiziert werden kann. Der Strukturvorschlag zugunsten einer 7-Hydroxyl-Substitution der Aloine wurde durch das ^{13}C -NMR-Spektrum des 7-Hydroxyaloin A bestätigt. Die Abb. **26** und **27** zeigen die ^1H - breitbandenkoppelten und Off-Resonance ^{13}C -NMR-Spektren, in Tab. **6** sind die ^{13}C -chemischen Verschiebungen und Off-Resonance Multiplizitäten im Vergleich zum Aloin A¹³⁾ zugeordnet. Das Formelbild der Abb. **28** veranschaulicht die getroffenen Zuordnungen. Die mit Hilfe additiver Verschiebungsinkremente der phenolischen Hydroxylgruppen auf die Basiswerte des Aloins A berechneten und gemessenen chemischen Verschiebungen stimmen nur bei einer 7-Hydroxylsubstitution sehr gut überein. Dies ist ersichtlich aus dem in Abb. **29** aufgezeigten Datenvergleich der gefundenen und berechneten (= Klammerausdrücke) δ -Werte. Diese Zuordnung findet weitere Bestätigung durch die Singulettmultiplizität des C-7-Signals in der Off-Resonance Aufnahme (Abb. **27**) gegenüber der Du-



^1H -entkoppelt
 $^1\text{ppm/cm}$



Abb. 24 : 250 MHz ^1H -entkoppeltes ^{13}C -NMR-Spektrum von 7-Hydroxyaloin A in CD₃OD

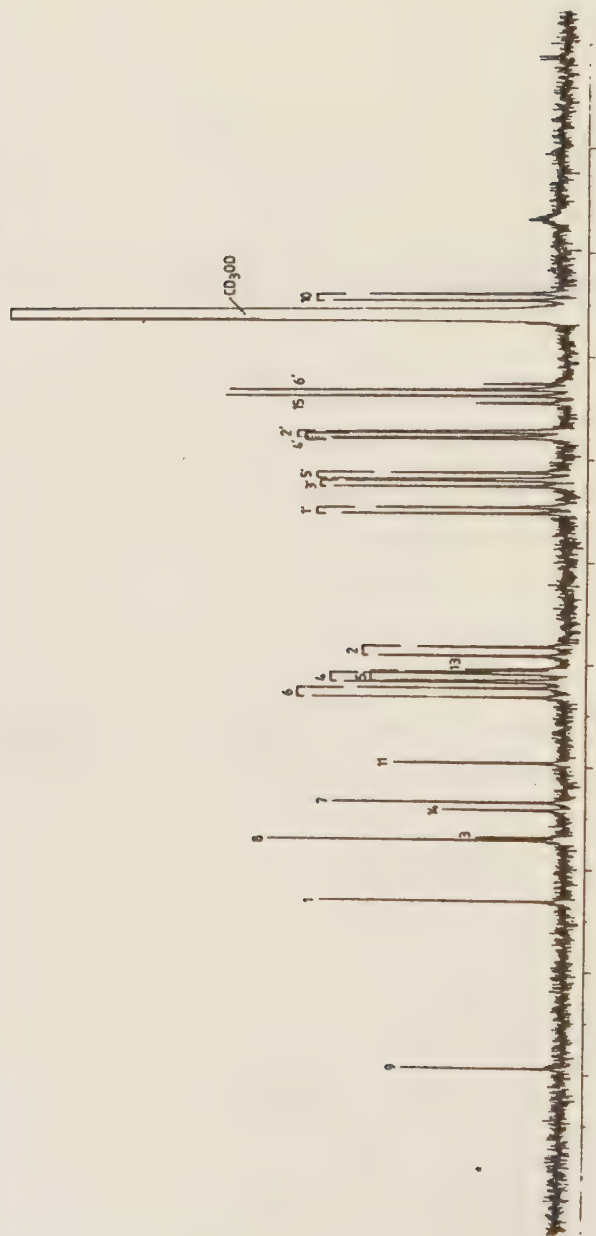


Abb. 25 : 250 MHz ^{13}C -NMR-Spektrum (off resonance-Aufnahme) von 7-Hydroxyvaloin A
in CD_3OD

Tabelle 6 : Zuordnung der ^{13}C -NMR-Verschiebungen für 7-Hydroxyaloin A in CD_3OD .

Meßfrequenz: 62,75 MHz

Die angegebenen δ (ppm) beziehen sich auf das CD_3OD -Septett bei $\delta = 49,14$ ppm. Die Multiplizitäten sind dem Off-Resonance-entkoppelten Spektrum entnommen.

	<u>7-Hydroxyaloin A</u>	<u>Alain A</u>
C-1	163,79 s	163,09
C-2	114,64 d	114,58
C-3	151,25 s	151,69
C-4	119,78 d	120,07
C-5	119,49 d	116,94
C-6	122,76 d	137,15
C-7	144,38 s	119,28
C-8	151,86 s	163,55
C-9	196,51 s	195,74
C-10	45,65 d	45,40
C-11	136,62 s	143,40 ^{a)}
C-12	119,03 s	118,79
C-13	118,10 s	117,88
C-14	145,88 s	146,71 ^{a)}
C-15	64,77 t	64,63
C-1'	87,05 d	86,72
C-2'	72,18 d	71,94
C-3'	81,78 d	81,74
C-4'	72,39 d	72,16
C-5'	80,26 d	80,11
C-6'	63,60 t	63,39

a) Zuordnung nach Lit.13. muß vertauscht werden⁴⁴⁾.

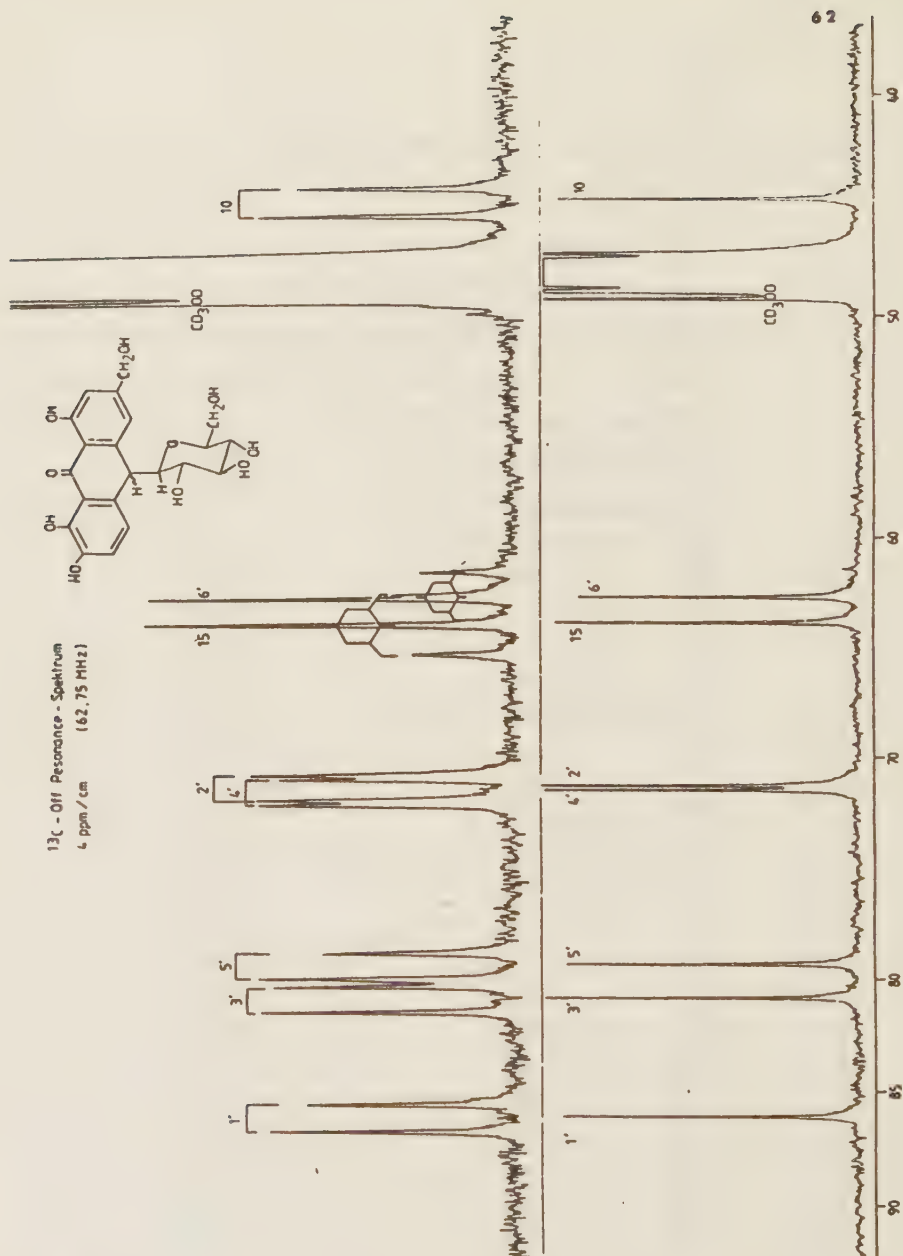
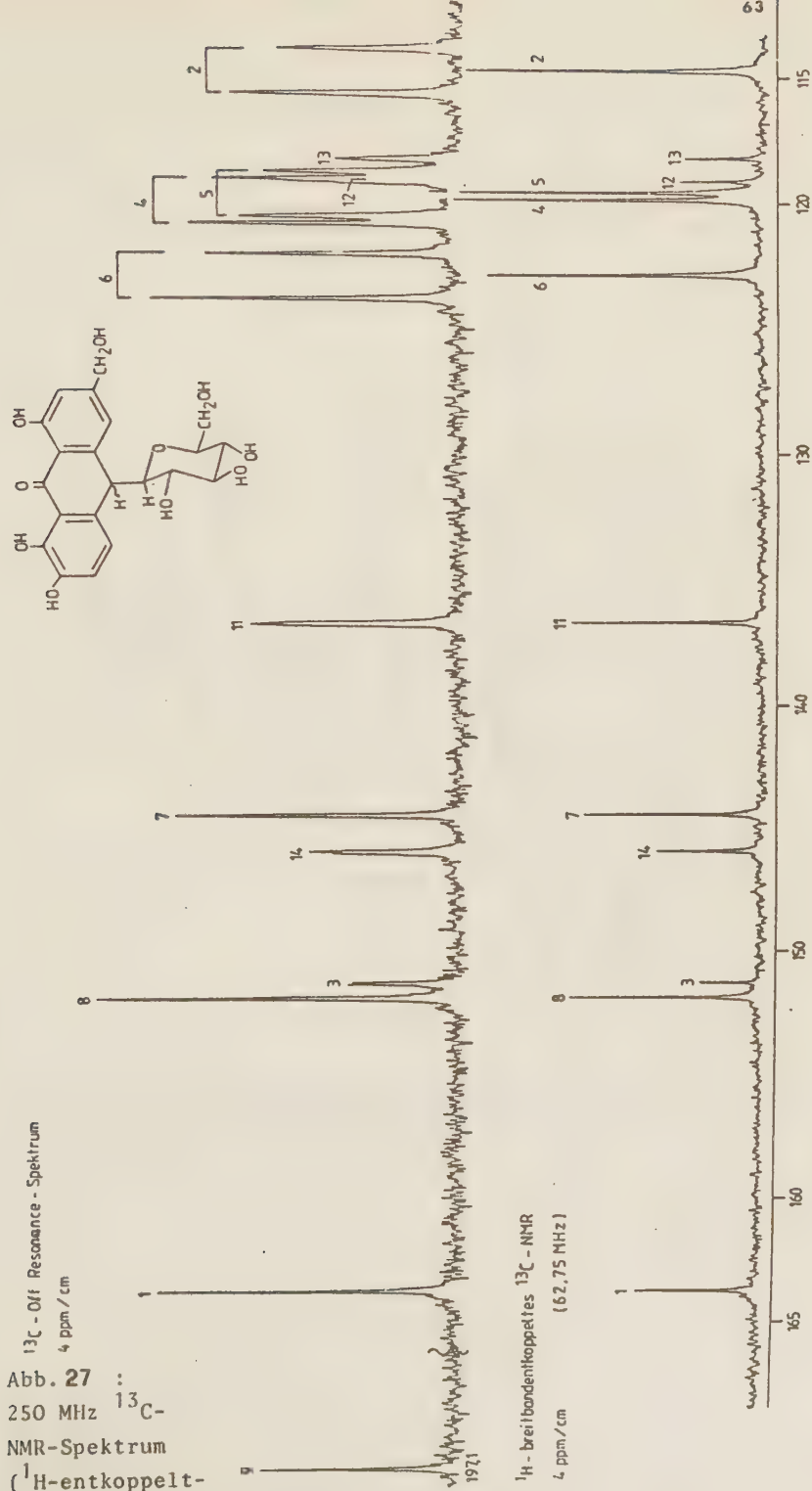


Abb. 26 : 250 MHz ^{13}C -NMR-Spektrum (^1H entkoppelt- bzw. off resonance-Aufnahme): Ausschnitt von 40-90 ppm

Abb. 27 :
 ^{13}C -
 NMR-Spektrum
 (^1H -entkoppelt-
 key off resonance-Aufnahme): Ausschnitt von 110-200 ppm



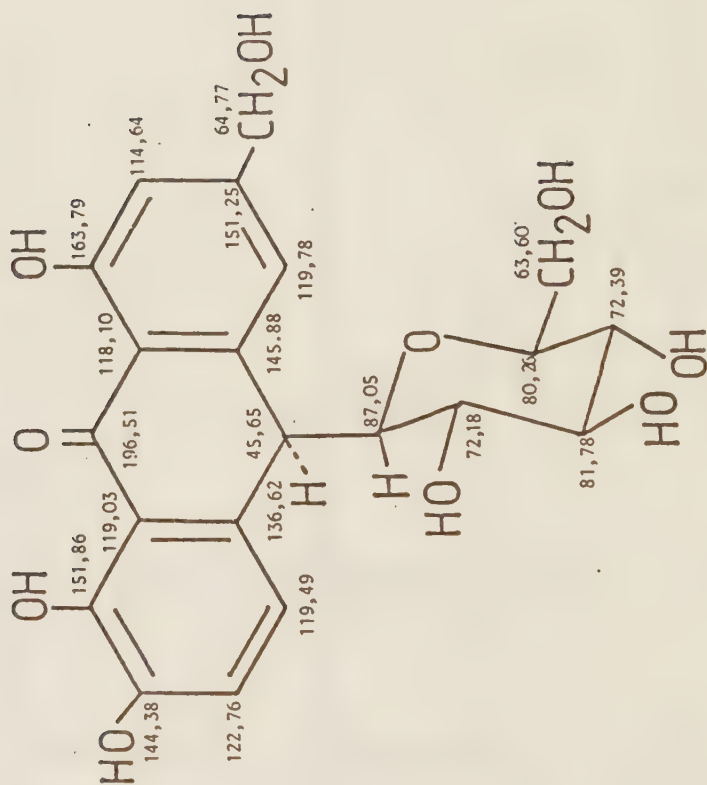
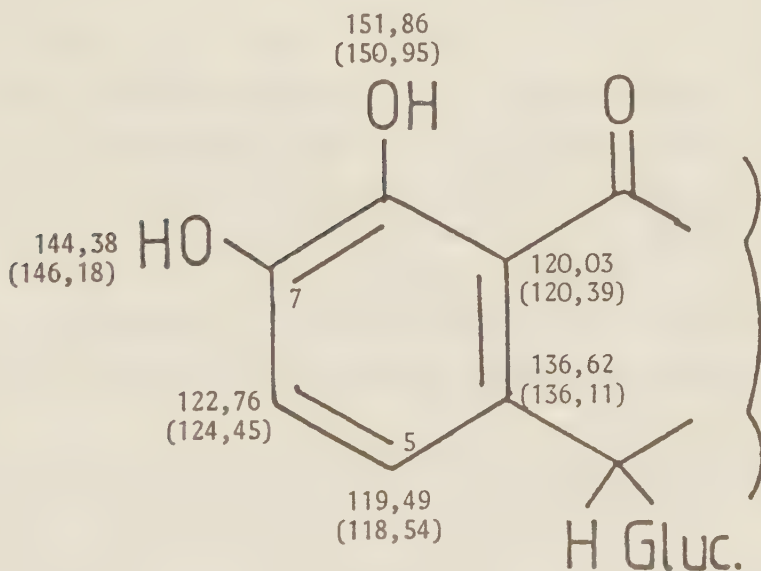


Abb. 28 : Zuordnung der ^{13}C -NMR-Meßdaten (δ /ppm/TMS) für 7-Hydroxyaloin A (Aufnahmemedium: CD_3OD)

MIT HILFE VON OH-INKREMENTEN AUF DIE BASISWERTE
DES ALOIN A⁺) BERECHNETE () UND GEMESSENE δ -WERTE
FÜR DIE ^{13}C -VERSCHIEBUNGEN VON 7-HYDROXYALOIN A:



+) E.Graf, E.Breitmaier u. M.Alexa,
Planta med. 40, 197 (1980)

blettaufspaltung des entsprechenden Aloinsignals. C-5 und C-6 treten dabei erwartungsgemäß als Dubletts auf. Im übrigen zeigt sich der Glukosylanthroncharakter in der Dublettaufspaltung der C-10-Resonanz bei $\delta = 45,6$ ppm (Abb. 26).

Der Vergleich aller NMR-Daten der 7-Hydroxyaloine A und B zeigt völlige Analogie zu den diastereomeren Aloinen A und B und ergibt demnach keine signifikanten Unterschiede in den chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten zwischen beiden Diastereomeren. Sie bestätigt die bei der Aloin-Analyse ⁴⁶⁾ getroffene Aussage, das eine Konfigurationsbestimmung von C-10 des Anthronrestes in den beiden 7-Hydroxyaloinen mit Hilfe der NMR-Spektren nicht möglich ist.

2.3.5. Charakterisierung des Peracetylderivats, Umwandelbarkeit 7-Hydroxyaloin A $\rightleftharpoons$ 7-Hydroxyaloin B

Die beidseitige Umwandlung der 7-Hydroxyaloine von der Anthronform zur tautomeren Anthranolform geht aus der Bildung eines einzigen Peracetylderivats hervor: die unter der UV-Lampe stark fluoreszierende Verbindung erwies sich als ein Nonaacetylderivat der Anthranolform, das sich durch ein Molekülion bei m/z 812 sowie vier Keteneeliminierungen aus vier phenolischen Hydroxylgruppen charakterisiert ist (Abb.30). Im IR-Spektrum des 7-Hydroxyaloinacetats belegen das Fehlen der Anthroncarbonylbande bei 1635 cm^{-1} sowie der breiten Chelatbande der Hydroxylvalenzschwingungen von $3100 - 3600\text{ cm}^{-1}$ das Vorliegen der Anthranolform. Die Abb.31 und 32 geben

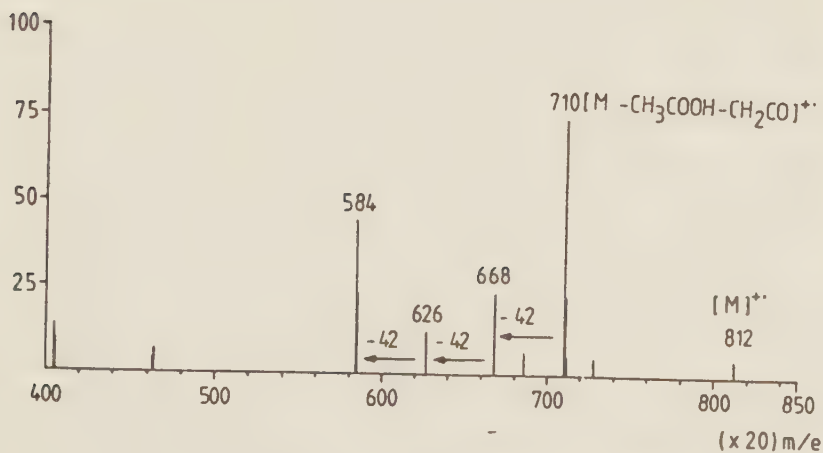
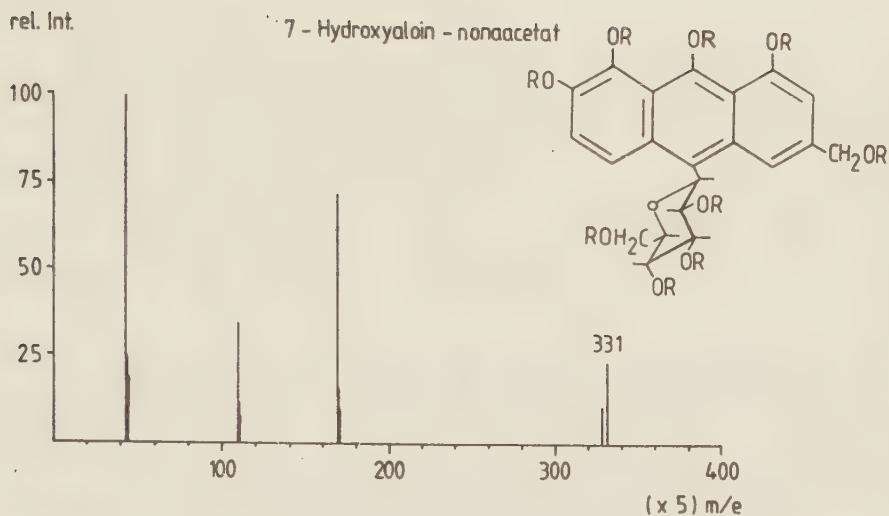


Abb. 30 : 70 eV EI-MS von 7-Hydroxyaloinnnonaacetat

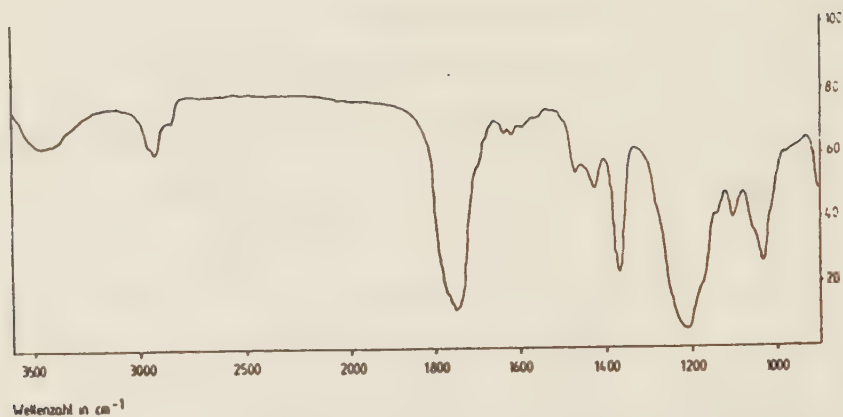


Abb. 31 : IR-Spektrum von 7-Hydroxyaloinnonoacetat

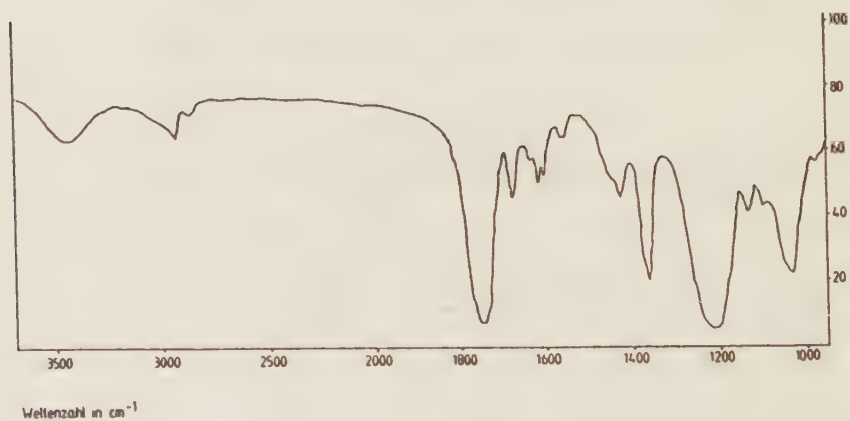


Abb. 32: IR-Spektrum von Aloin octoacetat

die IR-Spektren von 7-Hydroxyaloinnonaacetat und Aloin-octaacetat wieder und zeigen deutliche Übereinstimmung in den wesentlichen Banden. Die Bildung eines Anthranolderivats bei der Acetylierung von Glukosylanthronderivaten ist bereits für die Aloine und die Cascaroside beschrieben ^{10, 27)}.

Durch Erwärmen der wäßrigen Lösungen der Reinsubstanzen 7-Hydroxyaloin A oder B bildet sich - neben einigen Zersetzungsprodukten - ein Gleichgewicht zwischen den Diastereomerenpaaren, das dc zeitabhängig beobachtet wurde. Die für die Aloine A und B bekannte Boraxumlagerung ¹⁵⁾ führte überraschenderweise im Falle der 7-Hydroxyaloinen zu keinem nachweisbaren Umwandlungsprodukt. Möglicherweise verhinderte die gegenüber den Aloinen erhöhte Acidität aufgrund der zusätzlichen β -ständigen OH-Gruppe die Umlagerung, da unter gleichen Reaktionsbedingungen im Parallelversuch für Aloin A ein Gleichgewicht beider Diastereomeren beobachtet werden konnte. Unter der Voraussetzung, daß als Glukosylrest immer die D-Glukose in der Pyranoseform und in gleicher Weise, also in β -Bindung an das Anthrongerüst gebunden ist, muß der Unterschied zwischen den 7-Hydroxyaloinen A und B am Anthron-C-10 liegen, sie stellen also ein Diastereomerenpaar dar.

2.3.6. Optische Drehung

Die Messung des optischen Drehwertes ergab beim 7-Hydroxyaloin A einen positiven Drehsinn von $+23,5^{\circ}$ und für 7-Hydroxy-

aloin B einen negativen Drehsinn von -138° . Die Werte korrelieren mit denen der Aloine A ($+10,2^{\circ}$) und B (-73°)¹⁾.

2.3.7. CD-Spektren

Der Charakter diastereomerer 7-Hydroxyaloin wird auch aus den CD-Kurven deutlich (Abb. **33**, **34** und **35**)⁺. Zunächst bestehen deutliche Unterschiede in den Banden um 300 nm. Bei 306 nm zeigt das A-Diastereomere einen negativen, das B-Diastereomere einen positiven Cotton-Effekt unterschiedlicher Größe. Oberhalb 320 nm beobachtet man nur einen, beim B-Diastereomeren 2 Cotton-Effekte ebenfalls unterschiedlicher Intensität. Im Falle der Aloine verhalten sich diese Effekte genau umgekehrt (vgl. Abb. **35**). Der Vergleich der CD-Kurven der 7-Hydroxyaloin mit denen der Aloine (Abb. **35**) ergibt: die CD-Kurven von 7-Hydroxyaloin A und Aloin B sowie von 7-Hydroxyaloin B und Aloin A sind weitgehend identisch. Nach SNATZKE ist eher aus den unterschiedlichen Größen der Cotton-Effekte als aus ihren absoluten Vorzeichen abzuleiten, daß 7-Hydroxyaloin A und Aloin B und

⁺Herrn Prof. Dr. G. Snatzke, Lehrstuhl für Strukturchemie der Ruhruniversität Bochum, danke ich für die Aufnahme und Diskussion der CD-Spektren der 7-Hydroxyaloin A und B sowie der Aloine A und B.

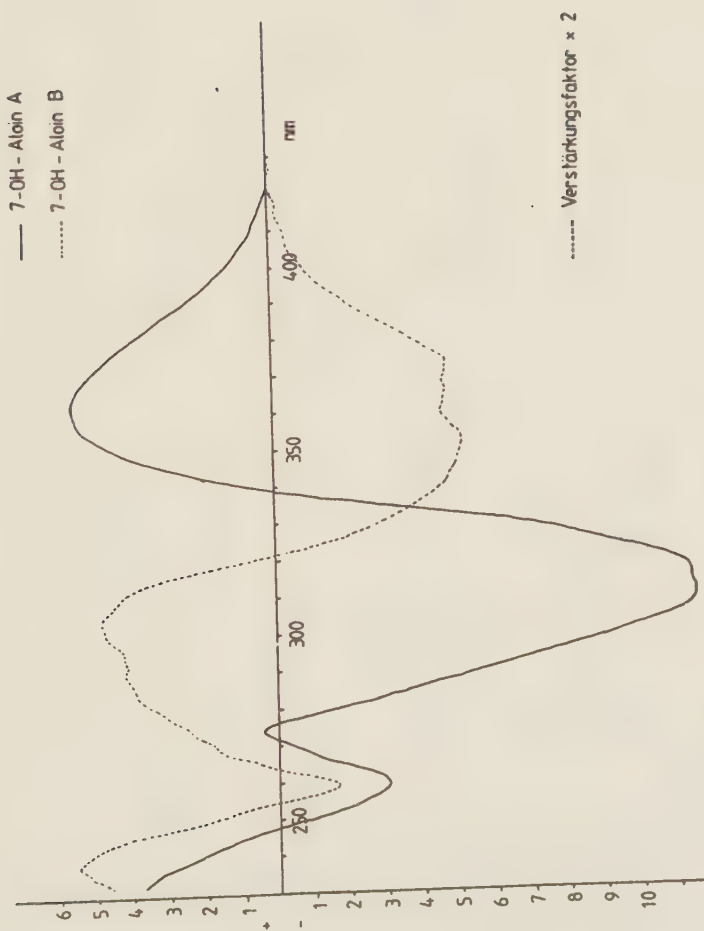


Abb. 33 : CD-Spektren der 7-Hydroxyalaine A und B

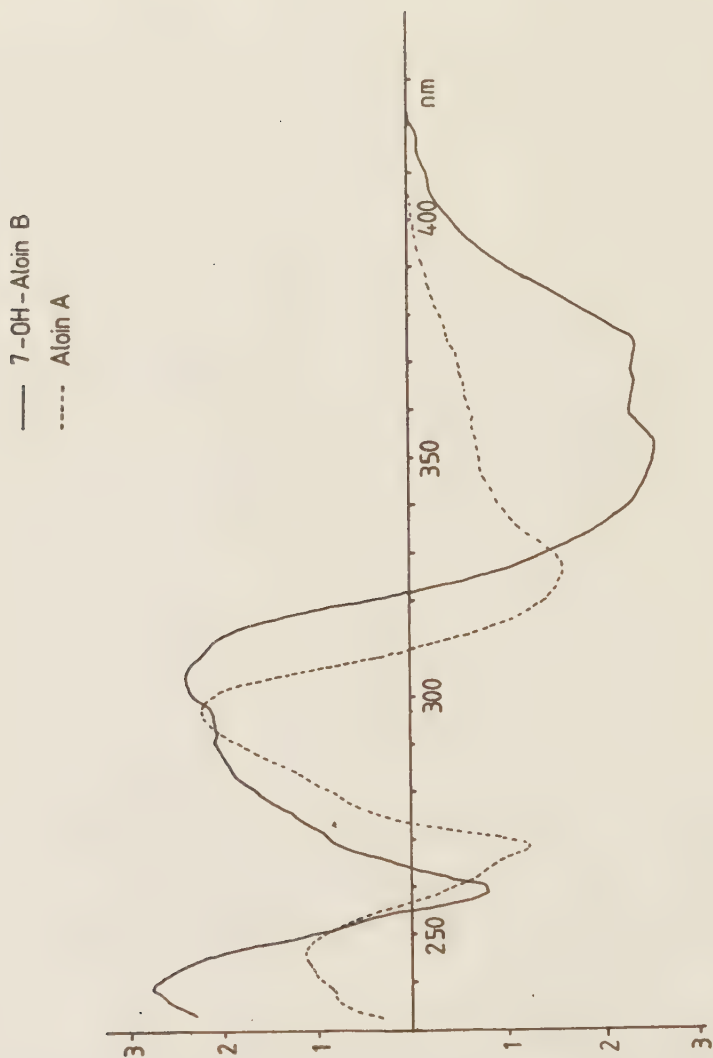


Abb. 34 : Gegenüberstellung der CD-Spektren von 7-Hydroxyaloin B und Aloin A

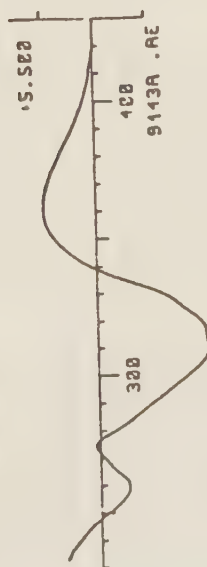
Aloin B



Aloin A



7-OH-Aloin A



7-OH-Aloin B



Abb. 35 : Gegenüberstellung der CD-Spektren der diastereomeren Aloine und 7-Hydroxyaloine

entsprechend die beiden anderen Verbindungen die gleiche Konfiguration am C-10 des Anthronteils haben.

2.3.8. Abschließende Bemerkungen

Insgesamt ist somit ableitbar, daß es sich bei der lange umstrittenen Struktur des "Isobarbaloins" aus *Aloe barbadensis* um ein Gemisch zwei an C-10 diastereomerer 7-Hydroxyaloin A und B handelt, die die Konstitution eines 10-C- β -D-Glukopyranosyl-3-hydroxymethyl-1,7,8-trihydroxy-9 (10 H)-anthracenon aufweisen. Die vorhandenen spektroskopischen und chiroptischen Daten reichen für eine Klärung der Absolutkonfiguration an C-10 nicht aus. Diese soll anhand einer Röntgenstrukturanalyse ermittelbar sein.

Der abschließende Vergleich der Eigenschaften der 7-Hydroxyaloin A und B und der Aloine A und B ist in Tab. 7 zusammengefaßt. Danach zeigen die jeweiligen A- und B-Diastereomeren in den physikalischen Konstanten der Schmelzpunkte, der Drehwerte und der NMR-Daten korrelates Verhalten, während sich der Circulardichroismus umgekehrt verhält.

2.4. Zum Aglykon der 7-Hydroxyaloin

Zur Stabilität der 7-Hydroxyaloin sind unter 2.3.4. Angaben gemacht. Aloine und 7-Hydroxyaloin unterliegen offenbar nicht den gleichen Zersetzungsmechanismen. In wäßrigen oder alkoholischen Lösungen der Aloine lassen sich schon nach wenigen Stun-

EIGENSCHAFTEN DER 7-HYDROXYALOINE IM VERGLEICH ZU DEN ALOINEN

	<u>Z-HYDROXYALOIN A</u>	ALOIN A	<u>Z-HYDROXYALOIN B</u>	ALOIN B
SCHMP.	156 - 70° C	148°	149 - 151°	138 - 40°
$[\alpha]_D^{20}$ (=0,25; CH ₃ OH)	+ 23,5°	+10,2°	- 138°	-73°
¹ H-NMR (δ)				
2'-OH	5,10 D	5,18 D	5,26 D	5,32 D
H-1'	3,28 DD	3,35 DD	3,24 D, BR	3,21 DD
	J=9,6:1,5	J=9,6:1,7	J=9,7	J=9,7:1,6
H-10	4,48 s, BR	4,56 s, BR	4,50 s, BR	4,56 s, BR
CIRCULARDICHROISMUS				
COTT.EFF. BEI				
$\Delta \epsilon$ 306 (295) NM	NEGATIV	POSITIV	POSITIV	NEGATIV
" "	-11.520	+2,220	+2,377	-6,520
ANZ. COTT.-EFF.				
VON 320 (310)-400 NM	1	2	2	1
CHEMISCHE STABILITÄT	LABIL	ZIEMLICH STABIL	SEHR LABIL	LABIL

den Aloeemodin, Glukose und Arabinose, entstanden durch oxidative Zersetzung, nachweisen. Entsprechende Lösungen der 7-Hydroxyaloeine verfärbten sich rot, das Aglykon konnte aus solchen Lösungen, auch nach wochenlangem Stehen, nicht nachgewiesen werden. Erst nach oxidativer Spaltung des nach 3.2.2.2. erhaltenen Kristallisats mit FeCl_3/HCl konnte, nachdem Aloeemodin durch Ausschütteln mit Tetrachlorkohlenstoff quantitativ entfernt wurde, mit Chloroform eine Verbindung ausgeschüttelt werden, die dem 7-Hydroxyaloeemodin zugeordnet wurde. Sie erwies sich als noch wesentlich instabiler als das Glukosylderivat. Nach schonendem Abdampfen des Chloroforms i.V. zeigten sich mehrere violetter Zonen. Eine dünnschichtchromatographische Darstellung findet sich in Abb. 12 .

Im stark konzentrierten Ätherextrakt von Curacao-Aloe konnte diese Verbindung im Gegensatz zum Aloeemodin nicht nachgewiesen werden.

3. Experimenteller Teil

3.1. Allgemeine Angaben

3.1.1. Chromatographie

Dünnschichtchromatographie

Zur DC wurden Kieselgel-Fertigplatten F_{254} Merck der Größe 20 x 20 cm verwendet. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe einer Universal UV-Lampe, Typ TL 900 der

Firma Camag.

Die Emissionsmaxima lagen wahlweise bei 254 und 366 nm.
Die Konzentrations- und Verhältnisangaben bei Laufmitteln beziehen sich auf Volumina (v/v).

Detektion

Zur Detektion wurden folgende Sprühreagentien verwendet:

a) Methanolische Kalilauge

5 g Kaliumhydroxid wurden in einem Gemisch von 90 T. Methanol und 5 T. Wasser gelöst.

b) Echtblausalz B

Frisch bereitete 0,5% wäßrige Echtblausalz-B-Lösung, anschließend mit 0,1 N Natronlauge besprühen.

c) Naturstoffreagenz

100 mg Diphenylboryloxyethylamin wurden in 10 ml Methanol gelöst.

d) Thymol/Schwefelsäure Reagenz

5 g Thymol wurden in 95 g Schwefelsäure (konz.) gelöst.

Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel Woelm (Korngröße 0,063 - 0,2 mm und Celite 545 (Johns-Manville) oder Polyamid der Fa. BASF (Divergan SZ 9010) durchgeführt. Die Konzentrationsangaben der Fließmittel beziehen sich auf Volumina (v/v).

Droplet Countercurrent Chromatography (DCCC)

Gerät: Modell DCC-A der Fa. Rikakikai Co. Ltd. Tokyo

Probenkammer: 10 ml Volumen

Säulenlänge: 40 cm

Säulendurchmesser: 2 mm

Fraktionssammler: Ultrarac 7000 (LKB)

Detektor: Uvicord S 2138 (LKB), die Elutionskurven
enthalten Transmissions- und Extinktions-
kurven, aufgenommen bei 280 nm (0-1 E)

Schreiber: Uvicord 2210- 2 Kanal-Flachbettschreiber
(LKB),
Chart: 0,1 oder 0,2 mm/min

3.1.2. Spektroskopie

UV-Spektroskopie

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem Varian Super-scan 3 Spektralphotometer aufgenommen. Als Lösungsmittel für die Proben wurden Lösungsmittel der Fa. Merck (Uvasole) und Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke verwendet.

IR-Spektroskopie.

Die IR-Spektren wurden mit einem Perkin Elmer Spektralphotometer Modell 8 297 aufgenommen. Zur Messung wurden KBr Presslinge hergestellt (1 mg Probe/150 mg KBr).

Massenspektrometrie

Massenspektroskopie

Die Massenspektren wurden mit einem Varian MAT CH-7 A Massenspektrometer bei 70 eV und variablen Temperaturen aufgenommen. Die hochaufgelösten Massenspektren wurden mit einem Massenspektrometer MAT 711/1787 bei 70 eV und variablen Temperaturen von Frau U. Ostwald und Herrn Dr. G. Holzmann am Institut für Organische Chemie der Freien Universität Berlin aufgenommen⁺. Die FAB-Massenspektren wurden von Herrn Dr. W. Gielsdorf bei der Fa. LAB, Neu-Ulm aufgenommen⁺.

⁺Frau U. Ostwald und Herrn Dr. G. Holzmann sowie Herrn Dr. W. Gielsdorf danke ich für die Aufnahme der hochauflösenden Massenspektren bzw. FAB-Massenspektren.

^1H - und ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Kernresonanzspektren wurden mit einem WM 250 der Fa. Bruker im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin aufgenommen. Als Lösungsmittel dienten DMSO-d_6 , Aceton d_6 (^1H -NMR) oder CD_3OD (^{13}C -NMR) mit Tetramethylsilan als innerem Standard. Alle Angaben der chemischen Verschiebung erfolgten in ppm-Werten nach der δ -Scala.

Optische Drehung

Die optische Drehung wurde mit einem Perkin Elmer Polarimeter 141 gemessen.

CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden von Herrn Prof. Dr. G. Snatzke im Institut für Strukturchemie der Ruhr-Universität Bochum gemessen.

3.1.3. Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte wurden mit einem Kofler Heiztischmikroskop der Fa. Reichert bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

3.1.4. Elementaranalysen

Die Mikroanalysen wurden im Pharmazeutischen Institut der Freien Universität Berlin durchgeführt.

3.2. Spezielle Angaben

3.2.1. Herkunft der Droge

Das Drogenmaterial wurde im Januar 1980 von der Fa. Müggenburg bezogen. Es war als Curacao-Aloe deklariert. In Identität, Reinheit und Gehalt entsprach es der Monographie Aloe barbadensis der Ph.Eur.III.

3.2.2. Bearbeitung der Droge

3.2.2.1. Anreicherung der Glukosyle mittels der Aceton/Isobutanol-Methode

Die Anreicherung der C-Glykosyle unter Entfernung der Harzteile, die für das mangelnde Kristallisationsvermögen der C-Glykosyle verantwortlich gemacht werden, erfolgt nach der von EDER und ZINN beschriebenen Aceton/Isobutanol Methode. 500 g Curacao-Aloe, mit einem Hammer zerkleinert und im Mörser pulverisiert, wurden 5 x mit 2 l Aceton 20 min am Ultra Turrax extrahiert. Die vereinigten Acetonauszüge wurden am Rotationsverdampfer auf die Hälfte ihres Volumens eingeeengt und 12 Std. im Kühlschrank stehengelassen. Von der sich

bildenden braunen Abscheidung wurde abfiltriert und bis zur Sirupkonsistenz eingeengt. Die Lösung wurde mit Isobutanol auf das Doppelte ihres Volumens gebracht und 12 Std. in den Kühlschrank gestellt. Das ausgefallene Rohaloin wurde abgenutscht, mit wenig eiskaltem Isobutanol nachgewaschen und im Hochvakuum getrocknet.

DC-Analyse: 7-Hydroxyaloin A und B, Aloin A und B, Aloesin

3.2.2.2. Anreicherung der diastereomeren Anthron-C-Glukosyle durch Mehrfachkristallisation

10 g Rohaloin wurden in 100 g Methanol unter leichter Erwärmung gelöst und in den Kühlschrank gestellt. Nach 2 Std. wurde der Niederschlag abgenutscht, die Mutterlauge auf die Hälfte ihres Volumens eingeengt und für mehrere Tage im Kühlschrank stehengelassen. Der Niederschlag wurde wiederum abgenutscht, die Mutterlauge ohne Erwärmung am Rotationsverdampfer eingeengt.

Die gesammelten Kristallisate wurden noch 2 - 4 x aus 5%igen methanolischen Lösungen umkristallisiert, die Mutterlauge wie oben beschrieben behandelt. Zur weiteren Reinigung wurden 3 g des Kristallisates in 100 g Wasser, dem als Oxidationsschutz 0,1 g Ascorbinsäure zugesetzt war, gelöst. Die Lösung wurde filtriert und 24 Std. in den Kühlschrank gestellt. Die Kristalle wurden abgenutscht, die Mutterlauge gefriergetrocknet.

DC-Analyse Kristallisat: 7-Hydroxyaloin A, Aloin A, ALX

DC-Analyse Mutterlauge: Starke Anreicherung von 7-Hydroxyaloin B, Aloin B, zudem weitere Inhaltsstoffe (s. Abb. 7), u.a. Aloesin

3.2.2.3. Isolierung von 7-Hydroxyaloin A und Aloin A mittels DCCC (Aufsteigender Arbeitsmodus)

Zur Feintrennung des nach 3.2.2.2. erhaltenen Kristallisats wurde die Droplet Countercurrent Chromatography eingesetzt, eluiert wurde im Fließmittel Chloroform : Methanol : Wasser : Ameisensäure 7 : 13 : 8 : 0,1 nach aufsteigendem Prinzip. 0,8 g des Kristallisats wurden in 10 ml Unterphase und Oberphase (2 : 1) des Fließmittelgemisches gelöst und in das Probenrohr gegeben. Die von den Trennsäulen aufgefangenen dc einheitlichen Fraktionen (Lösungsmittelverbrauch ca. 640 ml) der Verbindungen 7-Hydroxyaloin und Aloin A wurden vereinigt und am Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur i.V. von der organischen Phase befreit. Die wäßrigen Lösungen wurden gefriergetrocknet. Al A wurde aus ascorbinsäurehaltigem Wasser, 7-OH A aus ameisensäurehaltigem Wasser umkristallisiert. Die Mutterlaugen wurden gefriergetrocknet und zur DCCC wiederverwendet.

Ausbeute: 7-Hydroxyaloin A 0,14 g

Aloin A 0,5 g

3.2.2.4. Isolierung von 7-Hydroxyaloin A und Aloin A mittels DCCC (Absteigender Arbeitsmodus)

Es wurde mit dem unter 3.2.2.3. angegebenen Fließmittel eluiert. Die Oberphase diente als stationäre Phase. 1,2 g des nach 3.2.2.2. erhaltenen Kristallisats wurden in 10 ml des Gemisches aus Ober- und Unterphase gelöst (2 : 1). Nach 60 Std. (Lösungsmittelverbrauch 1,08 l) wurden die dc einheitlichen Fraktionen der Verbindungen 7-Hydroxyaloin A und Aloin A vereinigt. Das Abdampfen der organischen Phase i.V. am Rotationsverdampfer bei Zimmertemperatur wurde jeweils bei Einsetzen des Kristallisierens unterbrochen und die Lösungen über Nacht in den Kühlschrank gestellt. Die goldgelben Kristalle von 7-Hydroxyaloin A bzw. gelben Kristalle von Aloin A wurden abgenutscht und getrocknet. Die Mutterlaugen wurden von evtl. noch verbliebener organischer Phase befreit, gefriergetrocknet und zur DCCC wiederverwendet.

Ausbeuten: 7-Hydroxyaloin A 0,02 g

Aloin A 0,8 g

3.2.2.5. Isolierung von 7-Hydroxyaloin B und Aloin B mittels DCCC

Die Isolierung erfolgte im Lösungsmittelsystem Chloroform : Methanol : Wasser : Isopropanol : Ameisensäure 50 : 50 : 30 : 0,3 nach absteigendem Prinzip, d.h. die Unterphase bildete die mobile Phase. 2,4 g der getrockneten Mutterlauge aus

den Umkristallisierungen mit Methanol wurden in einem Gemisch aus Ober- und Unterphase gelöst und in das Probenrohr injiziert. Die Elution erstreckte sich über 92 Stunden (Lösungsmittelverbrauch 1,8 l). Aloin B wurde isoliert, indem die dünnschichtchromatographisch einheitlichen Reagenzgläser vereinigt und die organische Phase bei Zimmertemperatur am Rotationsverdampfer i.V. entfernt, der wäßrige Rückstand gefriergetrocknet wurde. Mit den 7-Hydroxyaloin B in der Hauptsache enthaltenden Reagenzgläsern wurde analog verfahren. Zur weiteren Reinigung wurde das Substanzgemisch der präparativen Dünnschichtchromatographie im Fließmittel Chloroform : Methanol : Wasser : Ameisensäure 7 : 13 : 8 : 0,1 (Kieselgelplatten F₂₅₄ Merck) unterworfen. Die 7-Hydroxyaloin B Zone wurde von der noch feuchten Platte abgeschabt und mit Methanol/Aceton 9 : 1 vom Kieselgel eluiert. Das Lösungsmittel wurde bei Zimmertemperatur am Rotationsverdampfer i.V. entfernt und der verbliebene Substanzrückstand nochmals mittels DCCC im Lösungsmittelsystem Chloroform : Methanol : Wasser : Ameisensäure 7 : 13 : 8 : 0,1, Unterphase als stationäre Phase, gereinigt. Die dc einheitlichen Lösungen in den Reagenzgläsern wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet.

Ausbeuten: 7-Hydroxyaloin B 0,014 g

Aloin B 0,12 g

3.2.2.6. Säulenchromatographische Vorversuche zur präparativen Isolierung von 7-Hydroxyaloin A

1 g des nach 3.2.2.2. erhaltenen Mehrfachkristallisats wurden an 100 g Polyamid mit Wasser und steigendem Methanolanteil eluiert. Eine andere Probe von 0,5 g Kristallisat wurde so an Kieselgel mit Essigester und steigendem Methanolanteil chromatographiert. Bei beiden Verfahren wiesen violett gefärbte Zonen auf den Sorbentien auf eine weitgehende Zersetzung des 7-Hydroxyaloins hin und führte zu keinem Trennergebnis.

3.2.2.7. Acetylierung des nach 3.2.2.2. erhaltenen Mehrfachkristallisats

1 g des Kristallisats wurden in Pyridin/Acetanhydrid (1 : 4) gelöst und 24 Std. bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluß stehengelassen. Die Mischung wurde unter ständigem Umrühren in Eiswasser gegeben. Der Niederschlag wurde abfiltriert, mit Eiswasser nachgewaschen und getrocknet. Versuche, durch Umkristallisieren kristalline Acetate zu erhalten, schlugen fehl. Das Dünnschichtchromatogramm des acetylierten Kristallisats im Fließmittel Chloroform/Aceton 95 : 5 wies aus, daß sich, wie auch von MÜHLEMANN⁴⁰⁾ für Aloinacetate beschrieben, eine Anzahl von Acetaten mit intensiv blauen, grünen und beigefarbenen Fluoreszenzen gebildet hatten. Nach Detektion mit HNO_3 25% und KOH zeigten 4 Flecke die violette Farbreaktion des 7-Hydroxyaloins.

3.2.2.8. Isolierung von 7-Hydroxyaloinnonaacetat aus dem nach 3.2.2.7. erhaltenen Acetatgemisch

400 mg des nach 3.2.2.7. erhaltenen Acetatgemischs wurden in Chloroform gelöst und auf eine Lobar Fertigsäule Lichroprep Si 60 Größe C (Merck) gespritzt.

Die Elution erfolgte zunächst mit Chloroform:Cyclohexan 9 : 1. Die Polarität des Elutionsmittels wurde kontinuierlich durch die Zugabe von insgesamt 0,5 T. Aceton erhöht. Die Wanderungsgeschwindigkeit der intensiv blau fluoreszierenden Hauptacetate des Aloins und von 7-Hydroxyaloin A (dc Fleck mit kleinstem R_f -Wert) konnte mit einer UV Lampe 366 nm direkt auf der Säule verfolgt werden. Nach Dünnschichtchromatographie (Chloroform:Aceton 95 : 5; Detektion HNO_3 25%/KOH) wurden die dc einheitlichen Reagenzglaslösungen des 7-Hydroxyaloinacetats vereinigt. Nach Entfernen des Lösungsmittels i.V. am Rotationsverdampfer, verblieb ein amorphes gelbes Pulver. Ein kristallines Acetat konnte aus Methanol nicht erhalten werden.

3.2.3. Chemischer Abbau und chemische Umwandlung der 7-Hydroxyaloine

3.2.3.1. Oxidative Spaltung von 7-Hydroxyaloin A mittels Eisen(III)-chlorid

10 mg 7-Hydroxyaloin A wurden in 3 ml Wasser gelöst. Nach Zugabe von 100 mg Eisen(III)-chlorid und 1 ml Salzsäure wurde 4

Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt. Die erkaltete Lösung wurde mit Bariumcarbonat neutralisiert und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde 4 x mit 5 ml Methanol extrahiert, die vereinigten Methanolphasen eingengt und auf eine Säule gebracht, die mit in Wasser suspendiertem Polyamid gefüllt war. Die Säule wurde mit Wasser eluiert. Der nicht gefärbte Vorlauf wurde gesammelt und zur Trockne eingengt und auf Kieselgelplatten im Fließmittel Isopropanol : Ethylacetat : Wasser 83 : 11 : 6 chromatographiert. Nach Detektion mit Thymol/Schwefelsäure waren Glukose (R_f 0,35) und Arabinose (R_f 0,42) nachzuweisen. Diese Ergebnisse stimmten mit denen überein, die erhalten wurden, wenn mit Aloin in gleicher Weise verfahren wurde.

3.2.3.2. Umwandlung 7-Hydroxyaloin $A \rightleftharpoons B$ und Aloin $A \rightleftharpoons B$ in Boraxlösung

Jeweils 2 mg der o.a. Substanzen wurden in 5 ml Wasser gelöst. 0,5 ml (O-Wert) wurden abpipettiert, die verbleibende Lösung mit 4,5 ml $Na_2B_4O_7$ -Lösung (2,5%) versetzt. Nach 5, 30, 60, 120 und 180 min, bei den 7-Hydroxyaloinen letztmals nach 24 h, wurden jeweils 0,5 ml Reaktionslösung entnommen, mit 0,5 ml 3 N H_2SO_4 und 8,5 ml Wasser versetzt und 3 x mit 10 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatlösungen wurden mit Wasser gewaschen, auf 1 ml eingengt und auf Kieselgelplatten bandförmig aufgetragen. Die Dünnschichtchromatographie erfolgte im Fließmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser/Ameisensäure (7 : 13 : 8 : 0,1).

3.2.3.3. Umwandlung 7-Hydroxyaloin $A \rightleftharpoons B$ und Aloin $A \rightleftharpoons B$ in wäßriger Lösung

Jeweils 1 mg der o.a. Substanzen wurden in 5 ml Wasser gelöst. Die Proben wurden im Wasserbad bei 50⁰ C erwärmt. In den unter 3.2.3.2. angegebenen Zeitintervallen wurden Proben entnommen und entsprechend dc untersucht.

Zusammenfassung und Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, die lange umstrittene Struktur des "Isobarbaloins" aus Aloe barbadensis (P.Eur.III) als an C-10 diastereomere 7-Hydroxyaloine A und B aufzuklären. Beide sind in der Literatur bisher nicht beschrieben und stellen neue Naturstoffe dar.

1. Anhand einer Literaturlauswertung wurde die geschichtliche Entwicklung zur chemischen Natur des sogenannten Isobarbaloins und des Aloins aus Aloe spec. dargelegt.
2. Im Fließmittelsystem Chloroform/Methanol/Wasser/Ameisensäure⁴⁴⁾ ließen sich für "Isobarbaloin" gegenüber der Arzneibuchvorschrift zwei Zonen nachweisen, die nach entsprechender Detektion violett gefärbt sind.
3. Zur Herstellung eines Rohaloins wurde die Methode der Mehrfachkristallisation aus Aceton und Isobutanol nach EDER und ZINN angewandt, da bei dieser Herstellungsmethode das kristallisierte Rohaloin u.a. das "Isobarbaloin" enthielt. Die weitere Mehrfachkristallisation aus Methanol lieferte Kristallisate, die vorwiegend mit Aloin A und

7-Hydroxyaloin A angereichert waren. Die komplex zusammengesetzten Mutterlaugen stellten dementsprechend Anreicherungen mit den jeweiligen B-Diastereomeren dar. Zusätzliches Umkristallisieren aus ascorbinsäurehaltigem Wasser führte selektiv zu einem Dreikomponentengemisch aus Aloin A, 7-Hydroxyaloin A und einer aloinartigen Verbindung unbekannter Konstitution, die z.Z. untersucht wird.

4. Die Reindarstellung der beiden diastereomeren 7-Hydroxyaloin A und B gelang durch den Einsatz der modernen DCCC-Technik. Die Verfahrensoptimierung zur Reindarstellung dieser äußerst oxidationsempfindlichen Verbindungen wurde ausführlich dargelegt. Als unerlässlich zugunsten einer erheblich gesteigerten Stabilität der 7-Hydroxyaloinlösungen erwies sich dabei die Zugabe von Ameisensäure zu den Lösungsmittelsystemen⁴⁴⁾. Als beste Trennvariante erwies sich zur Reindarstellung des 7-Hydroxyaloin A der absteigende Arbeitsmodus mit der organischen mobilen Phase des Systems Chloroform/Methanol/Wasser/Ameisensäure (7 : 13 : 8 : 0,1), die sowohl problemlos die Abtrennung von Aloin A in Grammengen als auch die schonende Aufarbeitung der entsprechenden Fraktionen gestattete. Zur Isolierung des 7-Hydroxyaloin B wurde die Polarität der organischen Phase durch den Zusatz von Isopropanol erhöht, wobei das chemisch sehr labile B-Diastereomere direkt aus den komplexen Mutterlaugen gewonnen werden konnte. Mit dieser Trennvariante konnten schließlich sowohl die Aloine A und B als auch die 7-Hydroxyaloin A und B in einem

Arbeitsgang direkt aus den Mutterlaugen in zur Strukturuntersuchung ausreichenden Mengen getrennt und rein dargestellt werden.

5. Mit Hilfe moderner spektroskopischer Methoden (FAB- und EI-MS, ^1H - und ^{13}C -NMR, CD, UV, IR) und mit Hilfe des oxidativen Glukosyl-Abbaus wurden die isolierten Verbindungen als an C-10 diastereomeren 7-Hydroxyaloine aufgeklärt. Sie entsprechen der Konstitution eines 10-C- β -D-Glukopyranosyl-3-hydroxymethyl-1,7,8-trihydroxy-9-(10 h)-anthracenons.
6. Die Auswertung der Circular dichroismogramme der 7-Hydroxyaloine im Vergleich zu den CD-Spektren der mittels DCCC isolierten Aloine A und B ergab, daß 7-Hydroxyaloin A und Aloin B sowie entsprechend 7-Hydroxyaloin B und Aloin A die gleiche Konfiguration am C-10 des Anthronteils haben. Die spektroskopischen und chiroptischen Daten reichen zur Klärung der Absolutkonfiguration von C-10 nicht aus. Diese ist nur anhand der Röntgenstrukturanalyse ermittelbar.
7. Der Vergleich der Eigenschaften der 7-Hydroxyaloine mit denen der Aloine zeigt, daß sich die jeweiligen A- bzw. B-Diastereomeren in den physikalischen Konstanten der Schmelzpunkte der Drehwerte und der NMR-Daten korrelativ verhalten, während sich ihr Circular dichroismus entgegengesetzt verhält.

Das genuine Vorliegen der beiden 7-Hydroxyaloin Diastereomeren im Drogenmaterial *Aloe barbadensis* wurde dünnschichtchromatographisch durch Cochromatographie mit den isolierten Verbindungen nachgewiesen. Die 7-Hydroxyaloine stellen

die Leitstoffe der Droge *Aloe barbadensis* in der Ph. Eur. III dar: die beiden wichtigen und offizinellen Handelssorten Kap- und Curacao-Aloe werden dc und anhand der Reagenzglasreaktion nach ROSENTHALER durch das vikariierende Auftreten der 7-Hydroxyaloine unterschieden. Mit der Strukturaufklärung der 7-Hydroxyaloine wurde somit ein Beitrag zur Grundlagenforschung der Arzneibuchanalytik geleistet.

Natürlich vorkommende 10-Glukosylanthronderivate sind bisher erst wenige gefunden worden. So sind bisher lediglich 7 Konstitutionen beschrieben, nämlich die Aloine, das Homonataloin, die Aloinoside, die Cascaroside A und B sowie C und D, das Cassialoin und das 11-Desoxyaloin.

Literatur

1. AUTERHOFF, H., E. GRAF, G. EURISCH und M. ALEXA:
Arch. Pharm. 313, 113 (1980)
2. AWE, W. und H.J. KÖMMEL: Arch. Pharm. 295, 819 (1963)
2. AWE, W. und H.J. KÖMMEL: Arch. Pharm. 293, 271 (1960)
3. BARNES, R.A. und W. HOLFELD: Chem. and Ind. 873 (1956)
4. BÖHME, H. und G. BERTRAM: Arch. Pharm. 288, 510 (1955)
5. BÖHME, H. und L. KREUTZIG: Arch. Pharm. 298, 262 (1965)
6. BÖHME, H. und L. KREUTZIG: Arzneim. Forsch. 16, 212 (1966)
7. Chemical Abstracts Chem. Subst. Index 93 (1980)
8. DURAND, M. und R. PARIS: Ann. Pharm. France 18, 846 (1960)
9. EDER, R. und W. ZINN: Pharm. Acta Helv. 20, 410 (1945)
10. FAIRBAIRN, J.W., C.A. FRIEDMANN und S. SIMIC:
J. Pharm. Pharmacol. 15, 292 (1963)
11. FAIRBAIRN, J.W. und S. SIMIC: J. Pharm. Pharmacol.
15, 325 (1963)
12. GARDNER, L. und L.W. JOSEPH: J. Am. Pharm. Ass. 26, 794 (1937)
13. GRAF, E., E. BREITMEIER und M. ALEXA: Planta Med. 40, 197 (1980)
13. GRAF, E. und M. ALEXA: Planta Med. 38, 121 (1980)
14. GROVES, T.B.: Pharm. J. 16, 128 (1856)
15. GRÖN, M.: Dissertation Regensburg (1981)

16. GRÜN, M. und G. FRANZ: Pharmazie 34, 669 (1979)
17. GÜNTHER, H.: NMR-Spektroskopie, Thieme Verlag Stuttgart (1973)
18. HAGER, H.: Pharm. Z'Halle 26, 130 (1885)
19. HÄNSEL, R.: Pharmazeutische Biologie, Spezieller Teil, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York (1980)
20. HÄNSEL, R. und H. HAAS: Therapie mit Phytopharmaka, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York Tokyo (1983)
21. HARBORNE, J.B.: Phytochemical Methods, Chapman and Hall London (1973)
22. HAUSER, F.: Pharm. Acta Helv. 6, 79 (1931)
23. HAY, E. und L.J. HAYNES: J. Chem. Soc. 3141 (1956)
24. HAYNES, L.J.: Übersicht in Adv. Carbohydrate, Chem. 18, 235 (1963)
25. HAYNES, L.J., J.I. HENDERSON und J.M. TYLER: J. Chem. Soc. 4879 (1960)
26. HEGNAUER, R.: Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 2 Birkhäuser Verlag Basel Stuttgart (1963)
27. HÖRHAMMER, L., H. WAGNER und G. BITTNER: Arzneim. Forsch. 13, 537 (1963)
28. HÖRHAMMER, L., H. WAGNER und G. BITTNER: Pharm. Ztg. 108, 259 (1963)
29. HÖRHAMMER, L., H. WAGNER und G. BITTNER: Z. Naturforsch. 196, 222 (1963)
30. HOFFENBERG, P.: Seifen-Fette-Öle-Wachse 105, 499 (1979)
31. HOLDWORTH, D.K.: Planta Med. 22, 54 (1972)

31. KEENAN, L. und L.H. WELSH: J. Am. Pharm. Ass. 31, 535 (1942)
32. KLUNGE, A.: Schweiz. W'schr. Chemie u. Pharmaz. 20, 497 (1882)
33. LEGER, M.E.: Compt. rend. d. S. Acad. d. Sci. Paris 127, 234 (1898)
34. LEGER, M.E.: Bull. Soc. Chim. France 27, 1227 (1902)
35. LEGER, M.E.: J. Pharm. Chim. 16, 592 (1902)
36. LEGER, M.E.: J. Pharm. Chim. 17, 52 (1903)
37. LEGER, M.E.: J. Pharm. Chim. 25, 513 (1907)
38. LEGER, M.E.: Ann. Chim. 5, 318 (1916)
39. MARKHAM, K.R. und V.M. CHARY: Carbon-13-NMR-Spectroscopy of Flavonoids in: The Flavonoids ed. by J.B. HARBORNE and T.J. MARBY, Chapman and Hall London
40. MÜHLEMANN, H.: Pharm. Acta Helv. 27, 17 (1952)
41. OGIHARA, Y., O. INOUE, H. OTSUKA, K.I. KAWAI, T. TANIMURA und S. SHIBATA: J. Chromatogr. 128, 218 (1976)
41. PROX, A.: Tetrahedron 24, 369 (1968)
41. RATTENBERG, M.: Dissertation München (1969)
42. RAUWALD, H.W.: Arch., Pharm. 315, 769 (1982)
43. RAUWALD, H.W.: Posterabstract der GFA-Tagung, Graz in Planta Med. 45, 151 (1982)
44. RAUWALD, H.W.: Habilitationsschrift, Freie Universität Berlin (1983)
45. RAUWALD, H.W. und H. MIETHING: Publ. in Vorbereitung

46. RAUWALD, H.W. und K. ROTH: ^1H -NMR-Analyse der diastereomeren Aloine, Arch. Pharm., im Druck
47. ROCHLEDER, CZUMPELIK: Chem. Zentralblatt 11, 29 (1866)
48. ROSENTHALER, L.: Pharm. Acta Helv. 12, 96 (1937)
49. ROSENTHALER, L.: Schweiz. Apoth. Ztg. 61, 640 (1923) zit. in Pharm. Z'Halle 64, 507 (1923)
50. SCHÄFER, G.L.: Pharm. Ztg. 42, 95 (1897)
51. SMITH, T. u. H.: Pharm. J. 11, 23 (1851)
52. STAHL, E. und W. SCHILD: Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1981)
53. STOLL, A. und B. BECKER: Fortschr. Chem. Org. Naturstoffe Hrsg. A. Zechmeister 7, 248 (1950)
54. THOMSON, R.H.: Naturally Occuring Quinones Academic Press London New York (1971)
55. TREUMANN: Dissertation Dorpat (1880) zit. n. 56
56. TSCHIRCH, A.: Handbuch der Pharmakognosie Bd. II Verlag Tauchnitz Leipzig (1917)
57. TSCHIRCH, A.: Ber. dtsch. pharm. Ges. 8, 174 (1898)
58. TSCHIRCH, A. und G. PEDERSEN: Arch. Pharm. 236, 200 (1898)
59. WICHTL, M. in: Ph. Eur. III, Kommentar, Hrsg. H. Böhme und K. Hartke Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
60. ZINN, W.: Dissertation ETH Zürich (1945)

Lebenslauf

Geburtsdatum: 10.7.1948
 Geburtsort: Osnabrück
 Eltern: Christel Vötig, geb. Schmidt und
 Ehemann Rudolf Vötig, Apotheker
 Schulbildung: 1954 - 58 Volksschule Hunteburg
 1958 - 69 Ratsgymnasium Osnabrück
 Reifeprüfung: Juni 1969
 Pharmazeutisches
 Praktikum: 1969 - 71 Hubertus und Malteser Apotheke in
 Osnabrück
 Pharmazeutische
 Vorprüfung: Juni 1971 in Osnabrück
 Berufstätigkeit: 1971 - 73 Adler Apotheke in Hunteburg
 Studium: SS 1973 -
 SS 1975 Chemie an der Freien Universität Berlin
 WS 1975/76 -
 WS 1977/78 Pharmazie an der Freien Universität
 Berlin
 April 1978 Staatsexamen
 Promotion: Mai 1978 Beginn der vorliegenden Arbeit unter
 Anleitung von Herrn Prof.Dr.R.Hänsel
 und Herrn Ass.Prof. Dr. Hans-W.Rauwald
 Lehrtätigkeit: Seit WS
 1979/80 als Lehrbeauftragter in den Praktika
 der Pharmazeutischen Biologie



_____ D. Hansen & K. Höpfner GbR _____

DISSERTATIONSDRUCK

Pestalozzistraße 106 (Ecke Bleibtreustraße)
Telefon 312 50 93 und 312 50 94

